



**FACULTAD DE FARMACIA  
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA**

# **Evaluación de nuevas estrategias para el desarrollo de terapias anticancerosas selectivas**

Memoria presentada por  
José Manuel Calderón Montaña  
para aspirar al Doctorado Internacional

Dirigida por  
Dr. Miguel López Lázaro

**Sevilla, 2013**







**1. ÍNDICE.** PAG -1-

**1.1. ÍNDICE DE FIGURAS.** PAG -6-

**1.2. ÍNDICE DE TABLAS.** PAG -10-

**2. RESUMEN/ABSTRACT.** PAG -13-

**3. ANTECEDENTES.** PAG -23-

**3.1. CÁNCER: GENERALIDADES.** PAG -25-

**3.2. CÁNCER DE PULMÓN. NECESIDAD DE FÁRMACOS ANTICÁNCEROSOS SELECTIVOS.** PAG -31-

**3.3. POSIBLES ESTRATEGIAS PARA EL DESARROLLO DE FÁRMACOS ANTICÁNCEROSOS SELECTIVOS.** PAG -39-

*3.3.1. Utilización de los defectos en la reparación del daño en el ADN como nueva diana terapéutica anticáncer.* PAG -44-

*3.3.2. Utilización de las alteraciones metabólicas de las células cancerosas como herramienta en la búsqueda de fármacos selectivos contra el cáncer.* PAG -117-

*3.3.2.1. Utilización de agentes prooxidantes para la inducción de muerte selectiva de células cancerosas.* PAG -119-

*3.3.2.2 Utilización de inhibidores de glicólisis para matar de forma selectiva células cancerosas.* PAG -147-

**4. OBJETIVO.** PAG -161-

**5. MATERIALES Y MÉTODOS.** PAG -165-

**5.1. COMPUESTOS EVALUADOS.** PAG -167-

**5.2. PREPARACIÓN DE EXTRACTOS VEGETALES.** PAG -170-

**5.3. DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO EN HETERÓSIDOS CARDIOTÓNICOS.** PAG -170-

**5.4. LÍNEAS CELULARES.** PAG -171-

**5.5. ANÁLISIS DE LA CITOTOXICIDAD MEDIANTE EL ENSAYO MTT.** PAG -172-

**5.6. EVALUACIÓN DE LA VIABILIDAD CELULAR MEDIANTE EL ENSAYO XTT.** PAG -174-

**5.7. DETERMINACIÓN DE LA VIABILIDAD CELULAR MEDIANTE EL ENSAYO DE SULFORODAMINA B.** PAG -174-

**5.8. ANÁLISIS DE LA SUPERVIVENCIA CELULAR CON EL ENSAYO CLONOGÉNICO.** PAG -175-

**5.9. DETECCIÓN DE APOPTOSIS MEDIANTE ANEXINA V-FITC Y CITOMETRÍA DE FLUJO.** PAG -176-

**5.10. EVALUACIÓN DEL DAÑO EN EL ADN MEDIANTE LA ELECTROFORESIS EN GEL DE CÉLULAS INDIVIDUALES (ENSAYO COMETA).** PAG -177-

**5.11. DETECCIÓN DE ROTURAS DE ADN DE DOBLE CADENA MEDIANTE EL ENSAYO INMUNOCITOQUÍMICO DE FORMACIÓN DE FOCOS DE  $\gamma$ -H2AX. PAG -179-**

**5.12. ANÁLISIS DE LA FORMACIÓN DE COMPLEJOS DE ROTURA ADN-TOPOISOMERASAS MEDIANTE LA TÉCNICA TARDIS. PAG -180-**

**5.13. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD GLICOLÍTICA CELULAR. PAG -182-**

**5.14. ANÁLISIS DE LA COMBINACIÓN DE FÁRMACOS. PAG -183-**

**5.15. ANÁLISIS ESTADÍSTICO. PAG -184-**

**6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN. PAG -185-**

**6.1 EPOXIALQUIL GALACTOPIRANÓSIDOS. PAG -187-**

*6.1.1. Actividad anticancerosa selectiva de epoxialquil galactopiranósidos en células de cáncer de pulmón. PAG -188-*

*6.1.2. Epoxialquil galactopiranósidos inducen daño en el ADN. PAG -190-*

*6.1.3. La reparación por escisión de nucleótidos participa en la reparación del daño en el ADN inducido por el epoxialquil galactopiranósido 35. PAG -192-*

*6.1.4. Epoxialquil galactopiranósido 35: formación de EROs e inhibición de la glicólisis. PAG -193-*

*6.1.5. El epoxialquil galactopiranósido 35 posee actividad anticancerosa selectiva in vitro frente a células cancerosas de mama y de melanoma. PAG -195-*

**6.2. AZIRIDINIL GALACTOPIRANÓSIDOS. PAG -198-**

*6.2.1. Actividad anticancerosa selectiva de derivados galactopiranósidos aziridínicos . PAG -199-*

*6.2.2. El compuesto 22 induce daño en el ADN que es reparado mediante escisión de nucleótidos. PAG -202-*

*6.2.3. Análisis del compuesto 22: formación de EROs e inhibición de la glicólisis. PAG -205-*

*6.2.4. Evaluación de la combinación del compuesto aziridínico 22 con 5-fluorouracilo y oxaliplatino. PAG -207-*

*6.2.5. El compuesto 22 mata de forma selectiva células cancerosas de mama y células de melanoma. PAG -209-*

**6.3. FENILGLIOXAL. PAG -211-**

**6.4. EXTRACTO ACUOSO DE TÉ VERDE Y SUS PRINCIPALES COMPONENTES. PAG -227-**

**6.5. ÁCIDO CLOROGÉNICO. PAG -231-**

**6.6. ALQUILÉTERES DE HIDROXITIROSIL. PAG -238-**

**6.7. EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO DE HOJAS DE *NERIUM OLEANDER* L. PAG -273-**

**6.8. HETERÓSIDOS CARDIOTÓNICOS DIGITOXINA, DIGOXINA Y OUABAÍNA. PAG -297-**

6.8.1. *Digitoxina, digoxina y ouabaína tienen actividad anticancerosa selectiva frente células cancerosas de pulmón A549. PAG -298-*

6.8.2. *Evaluación de los posibles mecanismos de selectividad anticancerosa de los heterósidos cardiotónicos. PAG -300-*

6.8.3. *Estudio de la combinación de digitoxina con agentes prooxidantes. PAG -306-*

6.8.4. *Evaluación del efecto combinatorio de heterósidos cardiotónicos y cisplatino. PAG -308-*

6.8.5. *Evaluación de la actividad anticancerosa de heterósidos cardiotónicos frente a diferentes tipos de células cancerosas. PAG -312-*

**6.9. LACTONAS ALFA, BETA-INSATURADAS 2-FURANONA Y 2-PIRONA. PAG -323-**

**6.10. INHIBIDORES DE GLICÓLISIS 2-DEOXYGLUCOSA, DICLOROACETATO Y BROMOPIRUVATO. PAG -347-**

6.10.1. *Evaluación de la actividad anticancerosa de 2-deoxiglucosa, dicloroacetato y bromopiruvato. PAG -348-*

6.10.2. *Evaluación de la combinación de inhibidores de la glicólisis y agentes prooxidantes. PAG -352-*

**6.11. ANTAGONISTAS DEL RECEPTOR NEUROKININA-1 (NK-1). PAG -353-**

6.11.1. *Evaluación de la actividad anticancerosa de una nueva serie de antagonistas del receptor NK-1. PAG -354-*

6.11.2. *Implicación de otros mecanismos en la actividad anticancerosa de una nueva serie de antagonistas del receptor NK-1. PAG -360-*

6.11.3. *El antagonista del receptor NK-1 INKB300b muestra actividad anticancerosa selectiva frente a cáncer de mama y melanoma. PAG -363-*

**6.12. OTROS. PAG -365-**

6.12.1. *Cribado de agentes prooxidantes. PAG -365-*

6.12.2. *Análogos de glicoglicerolípidos y derivados de urea. PAG -370-*

**6.13. DISCUSIÓN GLOBAL. PAG -372-**

**7. CONCLUSIONES/ CONCLUSIONS PAG -379-**

**8. ABREVIATURAS PAG -385-**

**9. AGRADECIMIENTOS PAG -389-**

**10. BIBLIOGRAFÍA PAG -393-**

**11. ANEXOS PAG -413-**

**11.1 ANEXO I. CONTROLES POSITIVOS Y NEGATIVOS. PAG -415-**

**1.1. ÍNDICE DE FIGURAS.**

*Figura 1. Habilidades adquiridas por células cancerosas. PAG -29-*

*Figura 2. Distribución de defunciones por causas, hombres y mujeres, a nivel mundial. PAG -30-*

*Figura 3. Muerte por causas, todas las edades, España, 2002. PAG -30-*

*Figura 4. Localización del tumor y supervivencia más de 5 años desde el diagnóstico. PAG -38-*

*Figura 5. Supervivencia más de 5 años desde el diagnóstico (1995-1999) de cáncer en Europa y España. PAG -39-*

*Figura 6. Principales efectos adversos producidos por los fármacos antineoplásicos utilizados en la terapéutica. PAG -41-*

*Figura 7. Lugar y mecanismo de acción de algunos de los fármacos anticancerosos utilizados en terapéutica. PAG -42-*

*Figura 8. Habilidades de las células cancerosas. PAG -44-*

*Figura 9. Principales agentes que dañan el ADN y las principales rutas de reparación que están implicadas. PAG -46-*

*Figura 10. Relación entre los niveles de EROs y cáncer. PAG -120-*

*Figura 11. Efecto del aporte exógeno de EROs. PAG -122-*

*Figura 12. Papel de la glicólisis en la detoxificación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. PAG -151-*

*Figura 13. Protocolo seguido para la realización del ensayo MTT. PAG -173-*

*Figura 14. Ejemplo del aspecto de las colonias tras 7 días de incubación sin tratamiento. PAG -175-*

*Figura 15. Ejemplo de cometa (núcleo celular dañado) y de las partes que lo constituyen. PAG -178-*

*Figura 16. Ejemplo del aspecto que presenta una célula con daño en el ADN evaluado mediante la técnica inmunocitoquímica de focos de  $\gamma$ -H2AX. PAG -180-*

*Figura 17. Ejemplo de imagen de células no tratadas y células tratadas con un veneno de topoisomerasa. PAG -182-*

*Figura 18. Estructura química de los compuestos epoxialquil galactopiranósidos evaluados. PAG -188-*

*Figura 19. Actividad citotóxica de derivados epoxialquil galactopiranósidos 32, 35 y 37 en células normales MRC-5 y células cancerosas A549 de pulmón. PAG -189-*

*Figura 20. Estudio del daño en el ADN mostrado por el epoxialquil galactopiranosido 35 mediante ensayo cometa. PAG -191-*

*Figura 21. Papel de la vía de reparación por escisión de nucleótidos (NER) en la reparación del daño en el ADN inducido por el epoxialquil galactopiranósido 35. PAG -193-*

*Figura 22. La citotoxicidad del compuesto 35 no es debida a la generación de EROs. PAG -194-*

*Figura 23. El compuesto 35 no induce inhibición de la glicólisis en células A549. PAG -195-*

*Figura 24. Células de cáncer de mama MCF7 y de melanoma UACC-62 son más sensibles que células normales de mama MCF10 y piel VH10 a la actividad citotóxica del epoxialquil galactopiranósido 35. PAG -196-*

*Figura 25. El epoxialquil galactopiranósido posee actividad citotóxica sobre células de cáncer colorrectal HTC116. PAG -197-*

*Figura 26. Estructura química de los compuestos galactopiranósidos aziridínicos evaluados. PAG -199-*

*Figura 27. Actividad citotóxica mostrada por derivados galactopiranósidos aziridínicos. PAG -200-*

*Figura 28. Actividad citotóxica mostrada por derivados galactopiranósidos con el grupo aziridinil abierto. PAG -201-*

*Figura 29. Generación de daño en el ADN por el compuesto aziridínico 22 mediante el ensayo cometa. PAG -203-*

*Figura 30. La vía de reparación por escisión de nucleótidos (NER) está implicada en la reparación del daño en el ADN por el compuesto 22. PAG -205-*

*Figura 31. Papel de la generación de EROs en el mecanismo de citotoxicidad del compuesto 22. PAG -206-*

*Figura 32. El compuesto 22 no induce inhibición de la glicólisis. PAG -207-*

*Figura 33. Actividad citotóxica del compuesto 22 en combinación con 5-fluorouracilo u oxaliplatino. PAG -208-*

*Figura 34. El compuesto 22 mostró actividad anticancerosa selectiva frente a células de cáncer de mama y células de melanoma. PAG -209-*

*Figura 35. El compuesto 22 posee actividad citotóxica sobre células de cáncer colorrectal HTC116. PAG -210-*

*Figura 36 (Figura 6 artículo adjunto). Muerte de células cancerosas por fenilglioxal. PAG -222-*

*Figura 37 (Figura 2 artículo adjunto). Evaluación del daño en el ADN inducido por fenilglioxal en células K562 por ensayo cometa. PAG -219-*

*Figura 38 (Figura 3 artículo adjunto). Evaluación del daño en el ADN inducido por fenilglioxal en células K562 y A48 por el ensayo de inmunofluorescencia de focos de  $\gamma$ -H2AX. PAG -219-*

*Figura 39 (Figura 4 artículo adjunto). Fenilglioxal induce complejos ADN-topoisomerasas en células K562 mediado por peróxido de hidrógeno. PAG -220-*

*Figura 40 (Figura 5 artículo adjunto). Papel de los mecanismos de reparación del daño en el ADN en la reparación del daño inducido por fenilglioxal. PAG -221-*

*Figura 41. Estructura química de epigallocatequina-3-galato, ácido gálico y pirogalol. PAG -227-*

*Figura 42. Evaluación de la citotoxicidad sobre células normales y cancerosas de pulmón de un extracto acuoso de té verde, ácido gálico (AG) y pirogalol (PG). PAG -228-*

*Figura 43. Evaluación de las vías implicadas en la reparación del daño en el ADN inducido por PG. PAG -230-*

*Figura 44. Evaluación de la citotoxicidad sobre células normales y cancerosas de pulmón de café y café verde solubles comerciales. PAG -232-*

*Figura 45. Estructura química del ácido clorogénico. PAG -233-*

*Figura 46. Papel de la generación de EROs en el mecanismo de citotoxicidad del ácido clorogénico. PAG -233-*

*Figura 47. El ácido clorogénico mostró mayor actividad citotóxica sobre células de cáncer de pulmón que sobre células normales de pulmón. PAG -234-*

*Figura 48. Evaluación del daño en el ADN inducido por el ácido clorogénico (ACG) en células K562. PAG -235-*

*Figura 49. Evaluación del daño en el ADN inducido por el ácido clorogénico (ACG) en células K562 y células AA8 mediante la técnica de inmunofluorescencia de focos de  $\gamma$ H2AX. PAG -236-*

*Figura 50. Ácido clorogénico induce complejos ADN-topoisomerasas en células K562 mediado por peróxido de hidrógeno (ensayo TARDIS). PAG -237-*

*Figura 51. Inducción de muerte en células cancerosas por el ácido clorogénico. PAG -238-*

*Figura 52 (Figura 2 del artículo adjunto). Citotoxicidad selectiva de hidroxitirosol y varios derivados alquil hidroxitirosil éter. PAG -269-*

*Figura 53 (Figura 3 del artículo adjunto). Posibles mecanismos de acción involucrados en la citotoxicidad de dodecil hidroxitirosil éter. PAG -270-*

*Figura 54 (Figura 4 del artículo adjunto). Actividad citotóxica de dodecil hidroxitirosil éter en combinación con el fármaco anticanceroso 5-fluorouracilo. PAG -271-*

*Figura 55 (Figura 5 del artículo adjunto). Células de cáncer de mama MCF7 son más sensibles que células normales de mama MCF10 a la actividad citotóxica de dodecil hidroxitirosil éter. PAG -272-*

*Figura 56 (Figura 1 del artículo adjunto). Células de cáncer de pulmón A549 son más sensibles que fibroblastos de pulmón no malignos humanos MRC-5 a la actividad citotóxica del extracto de Nerium oleander. PAG -293-*

*Figura 57 (Figura 2 del artículo adjunto). Catalasa y n-acetilcisteína previenen ligeramente la actividad citotóxica de NOE. PAG -294-*

*Figura 58 (Figura 3 del artículo adjunto). Inducción de daño en el ADN por NOE y papel de la recombinación homóloga en la reparación del daño en el ADN inducido por NOE. PAG -295-*

*Figura 59 (Figura 4 del artículo adjunto). NOE induce una marcada inhibición de la glicólisis en células A549. PAG -296-*

*Figura 60. Estructura química de los digoxina, digitoxina y ouabaina. PAG -298-*

*Figura 61. Los heterósidos cardiotónicos digoxina, digitoxina y ouabaina han demostrado actividad anticancerosa selectiva hacia células de cáncer de pulmón. PAG -299-*

*Figura 62. Papel de la generación de EROs en la citotoxicidad de heterósidos cardiotónicos. PAG -301-*

*Figura 63. Posible mecanismo del papel de la bomba  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasa en la activación de la glicólisis. PAG -303-*

*Figura 64. Heterósidos cardiotónicos inhiben la glicólisis en células A549. PAG -304-*

*Figura 65. Heterósidos cardiotónicos inhiben la glicólisis de células MRC-5 y células A549. PAG -305-*

*Figura 66 (Figura 7 artículo adjunto). Células cancerosas de pulmón humanas A549 son más sensibles que fibroblastos no malignos de pulmón humanos MRC-5 a la actividad citotóxica de 2-furanona y 2-pirona. PAG -346-*

*Figura 67 (Figura 2 artículo adjunto). Evaluación del daño en el ADN inducido por 2-furanona y 2-pirona en K562 por el ensayo cometa. PAG -341-*

*Figura 68 (Figura 3 artículo adjunto). Evaluación del daño en el ADN inducido por 2-furanona y 2-pirona en células K562 y AA8 por el ensayo de inmunofluorescencia de focos de  $\gamma$ -H2AX. PAG -342-*

*Figura 69 (Figura 4 artículo adjunto). Papel de la recombinación homóloga en la reparación del daño en el ADN inducido por 2-furanona y 2-pirona PAG -343-*

*Figura 70 (Figura 5 artículo adjunto). 2-Furanona y 2-pirona inducen complejos ADN-topoisomerasas en células K562 mediado por peróxido de hidrógeno (ensayo TARDIS). PAG -344-*

*Figura 71 (Figura 6 artículo adjunto). Evaluación de la capacidad de inducir apoptosis por 2-Furanona y 2-pirona mediante el ensayo de detección de apoptosis Anexina V-FITC. PAG -345-*

*Figura 72. Estructura química de los inhibidores de la glicólisis 2-deoxiglucosa, dicloroacetato y bromopiruvato. PAG -347-*

*Figura 73. Evaluación de la citotoxicidad de inhibidores de glicólisis en células de pulmón. PAG -349-*



*Figura 74. Evaluación de la citotoxicidad de inhibidores de glicólisis en células de piel. PAG -350-*

*Figura 75. Niveles de lactato producido y de glucosa consumida por las diferentes líneas celulares. PAG -351-*

*Figura 76. Actividad citotóxica de los inhibidores glicólisis DCA y 2DG en combinación con el agente prooxidante PG. PAG -352-*

*Figura 77. Estructura base para la elaboración de los antagonistas de receptores NK-1 ensayados durante esta tesis. PAG -354-*

*Figuras 78-80. Actividad citotóxica mostrada por antagonistas del receptor NK-1. PAG -355-357-*

*Figura 81. Papel de la generación de EROs y la inhibición de la glicólisis en el mecanismo de citotoxicidad del antagonista del receptor NK-1 INKB300b. PAG -361-*

*Figura 82. Evaluación del papel de la recombinación homóloga (HR) en la citotoxicidad del antagonista del receptor NK-1 INKB300b. PAG -363-*

*Figura 83. Células de cáncer de mama MCF7 y de melanoma UACC-62 son más sensibles que células normales de mama MCF10 y de piel VH10 al antagonista del receptor NK-1 INKB300b. PAG -364-*

*Figura 84. Estructura química de algunos de los compuestos prooxidantes ensayados. PAG -366-*

*Figura 85. Screening de la actividad anticancerosa selectiva de una serie de compuestos prooxidantes. PAG -367-*

*Figura 86. Porcentaje de viabilidad celular de células A549 y MRC-5 expuestas a una serie de nuevos glicolípidos y derivados de ureas. PAG -371-*

*Figura I. Citotoxicidad de fármacos anticancerosos sobre varias líneas celulares cancerosas y no cancerosas. PAG -414-*

*Figura II. Citotoxicidad de peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) sobre varias líneas celulares cancerosas y no cancerosas. PAG -415-*

*Figura III. Eliminación del efecto citotóxico del control positivo  $H_2O_2$  por antioxidantes. PAG -416-*

*Figura IV. Curcumina como control positivo de apoptosis. PAG -418-*

*Figura V. Daño en el ADN mostrado por los controles positivos camptotecina y peróxido de hidrógeno. PAG -419-*

*Figura VI. Inducción de focos de  $\gamma H2AX$  por rayos-X. PAG -420-*

*Figura VII. Formación de complejos ADN-topoisomerasas por los venenos de topoisomerasa camptotecina y etopósido. PAG -420-*

*Figura VIII. Influencia en la glicólisis de dicloroacetato, cisplatino y 5-fluorouracilo. PAG -421-*

**1.1. ÍNDICE DE TABLAS.**

*Tabla 1. Compuestos cuya actividad anticancerosa ha sido evaluada en esta tesis. PAG -167-*

*Tabla 2. Líneas celulares utilizadas en esta tesis. PAG -171-*

*Tabla 3. Valores de IC<sub>50</sub> de los derivados epoxialquil galactopiranosidos 32, 35 y 37 en células MRC-5 y A549 tras 48 horas de tratamiento por el ensayo MTT. PAG -188-*

*Tabla 4. Valores de IC<sub>50</sub> de los derivados aziridinil galactopiranosidos evaluados. PAG -202-*

*Tabla 5. Valores de IC<sub>50</sub> del compuesto 22 sobre distintas líneas celulares cancerosas y no cancerosas. PAG -210-*

*Tabla 6. Valores de IC<sub>50</sub> (media  $\pm$  SEM) que presentaron un extracto acuoso de té verde, AG y PG en células MRC-5 y A549 tras una exposición de 48 h. PAG -229-*

*Tabla 7. Valores de IC<sub>50</sub> (media  $\pm$  SEM;  $\mu$ M) obtenidos en las diferentes líneas celulares tras un tratamiento de 48 h con pirogalol. PAG -231-*

*Tabla 8 (Tabla 1 artículo adjunto). Actividad citotóxica de NOE en combinación con el fármaco anticanceroso cisplatino. PAG -291-*

*Tabla 9. Actividad citotóxica de digitoxina en combinación con varios agentes prooxidantes. PAG -307-*

*Tabla 10. Actividad citotóxica de digitoxina en combinación con cisplatino dependiendo del orden del tratamiento. PAG -309-*

*Tabla 11. Actividad citotóxica de digoxina en combinación con cisplatino dependiendo del orden del tratamiento. PAG -310-*

*Tabla 12. Actividad citotóxica de ouabaína en combinación con cisplatino dependiendo del orden del tratamiento. PAG -311-*

*Tabla 13. Media de los Índices de Combinación (CI), con un Intervalo de confianza del 95%, de las combinaciones de heterósidos cardiotónicos y cisplatino, según las concentraciones de éste último. PAG -312-*

*Tabla 14. Valores de IC<sub>50</sub> (media  $\pm$  SEM;  $\mu$ M) de los heterósidos cardiotónicos digitoxina, digoxina y ouabaína en diferentes líneas celulares tras 48 horas de tratamiento por el ensayo MTT. PAG -312-*

*Tabla 15 (Tabla 1 artículo adjunto). Citotoxicidad de digitoxina, digoxina y ouabaína en células humanas y células de roedores. PAG -322-*

*Tabla 16. Actividad citotóxica de heterósidos cardiotónicos en combinación con 5-fluorouracilo (5-FU) en células de cáncer colorrectal HT29. PAG -315-*

*Tabla 17. Valores de IC<sub>50</sub> (media  $\pm$  SEM; mM) de las diferentes líneas celulares tras 48 h de exposición a los distintos inhibidores de glicólisis. PAG -351-*

*Tabla 18. Valores de IC<sub>50</sub> de los antagonistas del receptor NK-1 evaluados. PAG -359-*

*Tabla 19. Valores de IC50 (media  $\pm$  SEM;  $\mu$ M) de las diferentes líneas celulares tras 48 h de exposición al antagonista del receptor NK-1 INKB300b. PAG -364-*

*Tabla 20. Valores de IC50 (media  $\pm$  SEM;  $\mu$ M) obtenidos del screening de agentes prooxidantes mediante el ensayo MTT. PAG -369-*

*Tabla 21. Valores de IC50 (media  $\pm$  SEM;  $\mu$ M) obtenidos mediante el ensayo MTT tras 48 h de exposición a los diferentes compuestos. PAG -372-*

*Tabla I. Valores de IC50 de diferentes compuestos utilizados como controles durante los ensayos MTT. PAG -413-*

*Tabla II. Ejemplos representativos de los valores de IC50 mostrados por los compuestos controles utilizados durante el estudio del papel de los mecanismos de reparación del daño en el ADN en el efecto citotóxico de los compuestos testados en esta tesis. PAG -417-*



## **2. RESUMEN**

### **Evaluación de nuevas estrategias para el desarrollo de terapias anticancerosas selectivas**

El cáncer es una enfermedad muy común y difícil de tratar. En países desarrollados, se estima que una de cada tres personas desarrolla esta enfermedad a lo largo de sus vidas y que únicamente la mitad de los afectados logra sobrevivir más de 5 años. A pesar de la implementación de campañas de diagnóstico precoz, un gran número de cánceres se diagnostican cuando células de un tumor primario ya han invadido tejidos cercanos y se han diseminado a través de la sangre o la linfa a otros tejidos del organismo. En esta fase de la enfermedad, denominada metástasis, las células del tumor ya no están localizadas y, por tanto, ya no pueden eliminarse mediante la cirugía o la radioterapia. La principal forma de tratamiento en esta fase de la enfermedad es la quimioterapia, que consiste en administrar fármacos de forma sistémica con el objetivo de que alcancen y maten a las células tumorales. Pero la gran mayoría de estos fármacos son tóxicos tanto para las células tumorales como para las células sanas, lo que causa una alta toxicidad en el paciente y hace necesario reducir las dosis de estos fármacos a niveles que son poco efectivos. La poca eficacia de la terapia anticancerosa en el tratamiento de pacientes con metástasis se refleja en los bajos porcentajes de supervivencia en estos pacientes. Por ejemplo, las estadísticas indican que el cáncer que más se diagnostica y más muertes causa a nivel mundial es el cáncer de pulmón, que en países desarrollados aproximadamente el 50% de los cánceres de pulmón se diagnostican cuando el paciente ya tiene metástasis distantes, y que únicamente el 3% de estos pacientes logra sobrevivir más de 5 años. Estos datos indican que es necesario buscar nuevas estrategias selectivas para el tratamiento de cánceres con metástasis, y especialmente para el cáncer de pulmón.

En la búsqueda de estrategias anticancerosas selectivas es importante encontrar diferencias entre las células cancerosas y las células normales que puedan explotarse desde el punto de vista terapéutico. Datos recientes indican que las células tumorales tienen defectos en la reparación de determinados tipos de daño genético. La utilización de compuestos que induzcan daños específicos en el ADN causaría la muerte de las células tumorales que carezcan de los mecanismos necesarios para repararlos. Las células normales, que no tienen esos defectos en la reparación del daño genético, repararían el daño y sobrevivirían al tratamiento con esos compuestos. También se ha demostrado recientemente que el metabolismo de las células cancerosas está alterado. A diferencia de las células normales, las células cancerosas activan la glicólisis de forma mantenida incluso cuando los niveles de oxígeno son adecuados (efecto Warburg), y generan niveles elevados de especies reactivas de oxígeno de forma constitutiva. Estas diferencias metabólicas hacen que las células cancerosas puedan ser más susceptibles que las células normales al tratamiento con inhibidores de la glicólisis y/o con compuestos prooxidantes.

## 2. RESUMEN

Tras revisar brevemente información general sobre el cáncer y aspectos básicos sobre el cáncer de pulmón, este trabajo analiza la literatura que sugiere que es posible matar células tumorales de forma selectiva explotando sus defectos en la reparación del daño en el ADN y sus alteraciones metabólicas. Fruto de este análisis se seleccionaron más de 100 compuestos (o estrategias), y su posible actividad anticancerosa selectiva se evaluó mediante el ensayo MTT en células cancerosas de pulmón (A549) y células no cancerosas de pulmón (MRC5). Posteriormente se evaluó la posible implicación de la inducción de daño en el ADN, de la inhibición de la glicólisis y de la capacidad de generar especies reactivas de oxígeno (capacidad prooxidante) en la actividad anticancerosa de los compuestos más selectivos. El daño en el ADN se evaluó mediante el ensayo del cometa y mediante las técnicas de inmunofluorescencias TARDIS y focos de  $\gamma$ H2AX. El tipo de daño genético y la implicación de dicho daño en la citotoxicidad de los compuestos activos se evaluaron mediante la utilización de líneas celulares deficientes en las principales rutas de reparación del daño en el ADN (VC8, EM9, EM9-V, UV4, UV5, UV61, KO40 y V3-3) y sus correspondientes líneas celulares no deficientes (VC8-B2, EM9-XH y AA8). La inhibición de la glicólisis se evaluó midiendo los niveles de glucosa (producto inicial de la glicólisis) y de lactato (producto final de la glicólisis) en el medio extracelular tras el tratamiento con el compuesto ensayado. La capacidad prooxidante se analizó evaluando si la actividad citotóxica del compuesto se reducía en presencia de compuestos antioxidantes (catalasa, *N*-acetilcisteína y MnTMPyP). También se emplearon los ensayos XTT, SRB, clonogénico y Anexina V-FITC para profundizar en los mecanismos citotóxicos de algunos compuestos activos. Finalmente, para confirmar la selectividad anticancerosa de los compuestos más activos, se utilizaron células cancerosas de mama (MCF7), piel (UACC62) y colon (HTC116) frente a células normales de mama (MCF10) y piel (VH10).

Varios compuestos demostraron una selectividad anticancerosa destacable. El epoxialquil galactopiranósido (2S,3S)-2,3-Epoxidecil 4,6-O-(S)-bencilideno- $\beta$ -D-galactopiranósido (compuesto 35) mostró actividad anticancerosa selectiva en células de cáncer de pulmón, mama y melanoma. Este compuesto indujo daño genético, en cuya reparación estuvo involucrada la vía de reparación por escisión de nucleótidos (NER). La aziridina derivada de galactosa 2-Metil-2,3-[N-(4-metilbencenosulfonil)imino]propil 2,3-di-O-bencil-4,6-O-(S)-bencilideno- $\beta$ -D-galactopiranósido (compuesto 22) también indujo selectividad anticancerosa en células de pulmón, mama y melanoma, que puede estar mediada por su capacidad de inducir daño genético que requiere NER para su reparación. Es de destacar que las dosis de esta nueva aziridina requeridas para matar células de cáncer de mama fueron aproximadamente 50 veces inferiores a las necesarias para matar células normales de mama. El compuesto dicarbonílico fenilglioxal presentó actividad anticancerosa selectiva sobre células cancerosas de pulmón. Esta actividad fue debida, al menos en parte, a la inducción de daño en el ADN y a la generación de peróxido

## 2. RESUMEN

de hidrógeno. Células deficientes en NER, recombinación homóloga (HR) y unión de extremos no homólogos (NHEJ) fueron más sensibles al efecto citotóxico de este compuesto. Estos datos indican que fenilglioxal produce aductos en el ADN y roturas de doble cadena, y sugieren que tumores con defectos en estas vías de reparación pueden ser hipersensibles al efecto citotóxico de este compuesto. Las lactonas  $\alpha,\beta$ -insaturadas 2-furanona y 2-pirona mostraron actividad citotóxica selectiva sobre células de cáncer de pulmón, e indujeron daño en el ADN que requiere HR para su reparación. El nuevo antagonista del receptor de neurokinina-1 INKB300b demostró una selectividad anticancerosa marcada sobre células de cáncer de pulmón, mama y melanoma. Resultados preeliminares sugieren que esta selectividad anticancerosa puede deberse, en parte, a su capacidad de inducir daño genético reparado por HR.

Los compuestos fenólicos pirogalol (presente en el compuesto mayoritario del té verde epigallocatequina-3-galato), ácido clorogénico (presente en el café) y dodecil hidroxitirosil éter (derivado sintético del compuesto presente en el aceite de oliva hidroxitirosol) también mostraron selectividad frente a células cancerosas de pulmón. La citotoxicidad de estos compuestos estuvo mediada, al menos en parte, por la producción de especies reactivas de oxígeno y por la generación de daño en el ADN. Las vías de reparación HR, NHEJ y Anemia de Fanconi (FA) estuvieron implicadas en la reparación del daño inducido por pirogalol, y la vía de reparación por escisión de bases (BER) en la de dodecil hidroxitirosil éter. La combinación de este derivado de hidroxitirosol con 5-fluorouracilo indujo un efecto sinérgico en células de cáncer de pulmón y un efecto antagónico en células normales de pulmón. Este compuesto también demostró actividad anticancerosa selectiva frente a células de cáncer de mama.

Debido a la posible implicación del transportador  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasa en la elevada capacidad glicolítica de las células cancerosas, y sabiendo que los heterósidos cardiotónicos son conocidos inhibidores de este transportador, se evaluó la actividad anticancerosa selectiva de varios heterósidos cardiotónicos (digitoxina, digoxina y ouabaína) y de un extracto hidroalcohólico de las hojas de una planta rica en heterósidos cardiotónicos (*Nerium oleander*). Los 3 heterósidos cardiotónicos y el extracto vegetal mostraron una elevada selectividad frente a células cancerosas de pulmón e indujeron una marcada inhibición de la glicólisis en estas células. También potenciaron la citotoxicidad de cisplatino en células de cáncer de pulmón al administrarse tras este fármaco anticanceroso. El extracto de *Nerium oleander* indujo daño en el ADN que requiere HR para su reparación. Cabe destacar que digitoxina inhibió el crecimiento de células cancerosas de pulmón a concentraciones más bajas que las presentes en el plasma de pacientes que utilizan este fármaco para el tratamiento de su enfermedad cardíaca.

En conclusión, los resultados obtenidos en este trabajo indican que es posible matar células cancerosas de forma selectiva explotando sus defectos en la reparación del daño en el ADN y sus alteraciones metabólicas. La marcada selectividad anticancerosa mostrada por



## **2. RESUMEN**

algunos de los compuestos ensayados requiere confirmación en modelos animales de cáncer. La actividad anticancerosa selectiva de digitoxina en células de cáncer de pulmón a concentraciones terapéuticas apoya la posible realización de ensayos clínicos en pacientes con este tipo de cáncer.

### **Evaluation of new strategies for the development of selective anticancer therapies**

Cancer is a very common and difficult-to-treat disease. It has been estimated that one out of three people in developed countries will develop cancer at some point in their lifetime, and that only half of the people diagnosed with cancer will manage to survive more than 5 years. Despite the implementation of early detection campaigns, many cancers are still diagnosed when cells from a primary tumor have already metastasized to other parts of the body. At this stage of disease, tumor cells are no longer localized and can no longer be eliminated by surgery or radiotherapy. The main form of treatment at this point is chemotherapy, which consists of delivering drugs systemically so that they can reach and kill the tumor cells. But most of these drugs are toxic to both tumor and normal cells, cause severe side effects in patients and, therefore, need to be used at suboptimal levels. The low efficacy of chemotherapy in patients with advanced cancers is reflected in the low 5-year survival rates observed in these patients. For instance, cancer statistics show that the most commonly diagnosed cancer in the world is lung cancer, that approximately 50% of patients diagnosed with lung cancer have distant metastasis, and that only 3% of these patients manage to survive more than 5 years. The low efficacy of cancer therapy for the treatment of patients with metastasis makes the development of selective anticancer strategies necessary.

In the search for selective anticancer strategies, it is important to identify differences between cancer cells and normal cells and that these differences can be exploited therapeutically. Recent data suggest that tumor cells commonly have defects in DNA repair genes which make them vulnerable to the cytotoxic activity of specific DNA-damaging compounds. Unlike tumor cells, normal cells have an intact DNA damage response that would allow them to repair the DNA damage and therefore to survive treatment with these DNA-damaging compounds. Recent evidence also suggests that the metabolism of tumor cells is altered. Unlike normal cells, cancer cells keep sustained glycolytic rates despite the presence of an adequate oxygen supply (Warburg effect), and generate high levels of reactive oxygen species constitutively. These metabolic differences may make cancer cells more vulnerable than non-malignant cells to treatment with glycolysis inhibitors and/or prooxidant agents.

After briefly reviewing basic concepts of cancer and general aspects of lung cancer, this work analyzes the literature suggesting that cancer cells can be selectively killed by exploiting their DNA repair defects and their metabolic alterations. This analysis was used to select over 100 compounds (and strategies), and their possible selective anticancer activity was evaluated against lung cancer cells (A549) and lung non-malignant cells (MRC5) using the MTT assay. Then, it was evaluated whether the most selective compounds induced DNA damage, inhibited

## 2. RESUMEN

glycolysis and generated reactive oxygen species (prooxidant activity). The induction of DNA damage was assessed by the comet assay, the gamma-H2AX focus assay and the TARDIS assay. The type of DNA damage and the involvement of such damage in the cytotoxicity of the most active compounds was evaluated by using cell lines deficient in the main DNA repair pathways (VC8, EM9, EM9-V, UV4, UV5, UV61, KO40 y V3-3) and their corresponding parental cell lines (VC8-B2, EM9-XH y AA8). Glycolysis inhibition was assessed by measuring concentrations of glucose (initial product of glycolysis) and lactate (final product of glycolysis) in supernatants of control and treated cells. The prooxidant activity was evaluated by assessing whether the cytotoxicity of the compound was reduced in cells pre-treated with specific antioxidants (catalase, *N*-acetylcysteine and MnTMPyP). Other assays (i.e., XTT, SRB, clonogenic and Annexin V flow cytometry assays) were used to further study the cytotoxic mechanisms of several active compounds. Finally, compounds with a high selective cytotoxicity towards lung cancer cells were also assessed against breast cancer cells (MCF7), melanoma cells (UACC62) and colon cancer cells (HTC116) vs. breast normal cells (MCF10) and skin normal cells (VH10).

Several compounds exhibited a remarkable selective cytotoxicity towards cancer cells. The epoxyalkenyl galactopyranoside (2S,3S)-2,3-epoxydecyl 4,6-O-(S)-benzylidene- $\beta$ -D-galactopyranoside (compound 35) induced selective cytotoxic activity against lung cancer cells, breast cancer cells and melanoma cells. This compound induced DNA damage, which may require a functional nucleotide excision repair (NER) pathway for repair. The new aziridine 2-methyl-2,3-[--(4-methylbenzenesulfonyl)imino]propyl 2,3-di-O-benzyl-4,6-O-(S)-benzylidene- $\beta$ -D-galactopyranoside (compound 22) induced a outstanding selective cytotoxic activity against lung cancer cells, breast cancer cells and melanoma cells, which may be mediated by its ability to induce DNA damage that requires NER for repair. It is worth noting that this aziridine killed breast cancer cells at concentrations 50-fold lower than those required to kill non-malignant breast cells. The guanidine-reactive agent phenylglyoxal induced selective cytotoxic activity against lung cancer cells. This activity was mediated, at least in part, by its ability to induce DNA damage and to generate hydrogen peroxide. Cells defective in NER, homologous recombination (HR) and non-homologous end joining (NHEJ) were more sensitive to phenylglyoxal than parental cells. These data suggest that phenylglyoxal may induce bulky distortions in the shape of the DNA double helix (which are repaired by the NER pathway) and DNA double-strand breaks (which are repaired by HR and NHEJ), and that tumor cells with defects in NER, HR and NHEJ may be hypersensitive to the cytotoxic activity of phenylglyoxal. The alpha, beta-unsaturated lactones 2-furanone and 2-pyrone displayed selective cytotoxicity towards lung cancer cells, and induced DNA damage that required HR for repair. The new neurokinin 1 (NK-1) receptor antagonist INKB300b induced a marked selective cytotoxicity

against lung cancer cells, breast cancer cells and melanoma cells. Preliminary data suggest that this selectivity may be mediated, in part, by its ability to induce DNA damage that requires HR for repair.

The phenolic compounds pyrogallol (a molecule present in the chemical structure the major green tea constituent epigallocatechin-3-gallate), chlorogenic acid (a major coffee constituent) and hydroxytyrosyl dodecyl ether (a synthetic derivative obtained from the virgin olive oil constituent hydroxytyrosol) displayed selective cytotoxic activity towards lung cancer cells. This cytotoxicity was mediated, at least in part, by their prooxidant activity and by their ability to induce DNA damage. Data suggest that the DNA repair pathways HR, NHEJ and Fanconi anemia (FA) were involved in the repair of pyrogallol-induced DNA damage, and that the base excision repair (BER) pathway played a role in the repair of the DNA damage induced by hydroxytyrosyl dodecyl ether. The combination of this hydroxytyrosol derivative with the anticancer drug 5-fluorouracil induced a synergistic cytotoxicity in A549 cancer cells but not in non-malignant MRC5 cells. This compound also displayed selective cytotoxicity against MCF7 breast cancer cells vs. MCF10 normal breast.

Since the  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$  pump may be involved in the high glycolytic activity of cancer cells, and since cardiac glycosides are known inhibitors of this pump, we next evaluated the possible selective anticancer activity of several cardiac glycosides (i.e., digitoxin, digoxin and ouabain) and of a hydroalcoholic extract from the leaves of the cardiac glycoside-containing plant *Nerium oleander*. All three cardiac glycosides and the plant extract displayed a high selective cytotoxic activity towards lung cancer cells and induced a marked inhibition of glycolysis in these cells. These drugs also increased the cytotoxicity of cisplatin when administered after this commonly used anticancer agent. The *Nerium oleander* extract induced DNA damage that required HR for repair. It is worth noting that digitoxin inhibited the growth of lung cancer cells at concentrations below those commonly found in the plasma of cardiac patients treated with this drug.

In conclusion, this work supports the idea that cancer cells can be killed selectively by exploiting their DNA repair defects and their metabolic alterations. The marked selective cytotoxicity displayed by some compounds towards cancer cells warrants further evaluation in animal models. The anticancer activity of digitoxin in lung cancer cells at therapeutic concentrations supports its possible advancement into clinical trials for the treatment of patients with lung cancer.

## **2. RESUMEN**

### **3. ANTECEDENTES**

### **3. ANTECEDENTES**

### **3. ANTECEDENTES**

#### 3.1. CÁNCER: GENERALIDADES.

El cáncer es una de las enfermedades de mayor relevancia en el mundo por su incidencia, prevalencia y mortalidad. Realmente, el cáncer es un término que comprende un conjunto de enfermedades diversas y, a veces, muy diferentes entre sí, existiendo más de 100 tipos diferentes de cáncer. Cada uno de ellos puede tener características completamente diferentes, pudiendo llegar a considerarse enfermedad independiente, con sus causas, su evolución y su tratamiento específico<sup>1</sup>. Sin embargo, todo cáncer se caracteriza por una proliferación incontrolada de células, las cuales son capaces de invadir otros tejidos y órganos, extendiéndose a otras partes del cuerpo a través de la sangre y la linfa<sup>2,3</sup>. Esta proliferación incontrolada diferencia al cáncer de otras alteraciones en las que también se produce una proliferación celular y que son consideradas benignas (hiperplasia, metaplasia y displasia). Sin embargo, estas alteraciones benignas pueden llegar a evolucionar a cáncer si las células que las forman adquieren una capacidad de proliferación descontrolada.

Normalmente, las células se dividen de una manera controlada para reemplazar a células envejecidas, dañadas o muertas, manteniendo de este modo la integridad y el correcto funcionamiento de los distintos órganos. El proceso de división celular está regulado por una serie de mecanismos que indican a la célula cuándo debe permanecer quiescente y cuando dividirse. También existen mecanismos de inducción de muerte celular para controlar el número de células y para eliminar células que presenten daños o alteraciones, evitando de esta forma que esos daños sean transmitidos a las células hijas. En ocasiones, este proceso ordenado se descontrola, originando una proliferación incontrolada que da lugar a una masa de células que es lo que se conoce como tumor. Pero no todos los tumores son considerados cancerosos. Los tumores pueden ser clasificados en benignos (no cancerosos) o malignos (cancerosos). Los tumores benignos no crecen de forma agresiva, por lo que no llegan a invadir tejidos adyacentes ni tejidos u órganos distantes. Este tipo de tumor no suele ser considerado una amenaza para la vida de la persona, pudiendo ser extraído mediante cirugía, sin que suela volver a reaparecer. Sin embargo, cuando las células que constituyen dicho tumor adquieren la facultad de invadir tejidos y órganos adyacentes o distantes, ese tumor pasa a ser considerado tumor maligno o cáncer. Si las células cancerosas que forman ese tumor maligno se separan de él y entran en el sistema linfático o en el torrente sanguíneo, éstas pueden diseminarse por el cuerpo, pudiendo llegar a formar nuevos tumores en otros órganos. Esta diseminación y formación de nuevos tumores es lo que se conoce como metástasis o cáncer/tumor metastático<sup>2,3</sup>. Cabe destacar que las células de estos nuevos tumores suelen tener las mismas características morfológicas y moleculares que las del tumor original o primario.

Dependiendo del tejido/órgano en el que se originó el cáncer, éste puede ser clasificado de forma amplia en:



### 3. ANTECEDENTES

\* Carcinoma: es aquel cáncer que empieza en la piel o en tejidos que revisten los órganos internos. Hay varios subtipos de carcinoma, entre ellos, el adenocarcinoma (originado en las células glandulares), el carcinoma de células basales (empieza en la parte más interna de la epidermis), el carcinoma de células escamosas (comienza en las células escamosas de la superficie de la piel, el revestimiento de los órganos huecos del cuerpo y el revestimiento de los aparatos respiratorios y digestivo) y el carcinoma de células de transición (se origina en células con capacidad de variar su tamaño y que recubren órganos internos).

\* Sarcoma: cáncer que se origina en hueso, cartílago, tejido graso, músculo, vasos sanguíneos u otro tejido conjuntivo o de sostén.

\* Leucemia: es un cáncer que afecta a la médula ósea, causando la producción de grandes cantidades de células sanguíneas anormales.

\* Linfoma y mieloma: son cánceres que afectan a las células del sistema inmunitario.

\* Cánceres del sistema nervioso central: son cánceres que comienzan en los tejidos del cerebro o de la médula espinal.

Como se ha comentado, ésta es una clasificación muy genérica de los tipos de cáncer. Pero independientemente del tipo de cáncer, todos se deben a la transformación de una célula normal en célula cancerosa. Con el nacimiento de la teoría celular en 1824, se pensó en una causa única para todos los tipos de cáncer, pero actualmente se sabe que su etiología es multifactorial<sup>1</sup>. Existen numerosas hipótesis sobre cómo se origina el cáncer, pero todas tienen en común que el cáncer es el resultado de un cúmulo de alteraciones en el ADN<sup>4,5</sup>, llegándose a considerar el cáncer como una enfermedad genética. Estas alteraciones pueden ser de naturaleza muy distinta (mutaciones, silenciamiento, cambios de expresión génica, etc.) y pueden ser inducidas por una gran variedad de factores tanto externos como internos. Los factores internos son muy variados y dependen de cada persona. De entre los factores internos más importantes se encuentra la predisposición genética, que se basa en alteraciones genéticas que son heredadas desde los progenitores, y los errores en la secuencia genética, que pueden ser producidos al azar durante la replicación celular, dando lugar a mutaciones. Los factores externos reciben el nombre de carcinógenos y pueden ser de naturaleza variada: físicos, como la radiación de luz ultravioleta; químicos, como el tabaco; o biológicos, como el virus del papiloma humano. El hecho de que estos factores sean externos, hace que sean modificables y, por tanto, las personas pueden modificar sus hábitos para evitar el contacto con ellos. En este principio se basan las campañas de salud pública para la prevención del cáncer.

Ya sea por unos factores o por otros, el proceso de generación de cáncer o carcinogénesis, es un proceso que suele llevar años para que se produzca el número suficiente de alteraciones génicas que desencadenarán el cáncer. Las alteraciones génicas afectan principalmente a genes

### 3. ANTECEDENTES

involucrados en la supresión de tumores, a oncogenes y a los genes reparadores del daño en el ADN<sup>6</sup>. Los genes involucrados en la supresión de tumores codifican proteínas que van a estar involucradas en la inhibición del crecimiento celular y en la inducción de apoptosis en células dañadas. Los oncogenes son la forma alterada de los protooncogenes, que son genes normales encargados de regular las señales de proliferación celular. En condiciones normales, la expresión de los protooncogenes está estrictamente regulada. La mutación de estos genes da lugar a lo que se conocen como oncogenes, cuya expresión está descontrolada. Mientras que los genes reparadores del daño en el ADN son aquellos que codifican proteínas involucradas en los mecanismos de reparación del daño genético, ayudando a mantener la estabilidad genética. Mutaciones sobre estos genes pueden contribuir a la inestabilidad genética. Son necesarias las alteraciones sobre todos estos tipos de genes para que las células adquieran un fenotipo maligno por el cual adquieren una serie de habilidades que permiten a las células proliferar de forma descontrolada. Estas habilidades se conocen como “las huellas del cáncer”<sup>4,5</sup>(Figura 1):

1º) Capacidad para proliferar sin la necesidad de recibir las señales necesarias para ello (factores de crecimiento).

Las células normales requieren señales de crecimiento mitogénicas antes de que ellas puedan pasar de un estado quiescente a un estado de proliferación activa. Ninguna célula normal puede proliferar en ausencia de tales señales estimuladoras. A diferencia de las células normales, las células cancerosas no necesitan estas señales de proliferación al ser capaces de generar sus propias señales mitogénicas. Por ejemplo, se sabe que muchos oncogenes actúan mimetizando señales de proliferación. Por otro lado, las células cancerosas también pueden tener aumentada la expresión de receptores de crecimiento, haciéndolas más sensibles a las señales de proliferación.

2º) Capacidad para ignorar las señales de inhibición del crecimiento de las células contiguas.

En un tejido normal, las células reciben numerosas señales antiproliferativas para mantener la quiescencia celular y la homeostasis. Las células cancerosas presentan menor número de receptores o receptores disfuncionales de estas señales antiproliferativas, lo que les permite proliferar ignorando estas señales.

3º) Capacidad para evadir mecanismos de muerte celular (apoptosis).

Cuando en una célula normal se produce un daño genético que no se puede reparar, se activan una serie de señales que acaban desencadenando una muerte celular programada o apoptosis. Las células cancerosas presentan alteraciones en el ADN que, en condiciones normales, desencadenarían el proceso de apoptosis. Sin embargo, estas células son capaces de evadir este sistema de muerte celular debido a la presencia de mutaciones en genes necesarios

### 3. ANTECEDENTES

para desencadenar la apoptosis. El mayor ejemplo de esta capacidad de evasión de apoptosis es la mutación en el gen p53 que codifica una de las proteínas proapoptóticas más importante. El 50% de los cánceres humanos presentan mutado o ausente este gen.

#### 4º) Habilidad para estimular la angiogénesis.

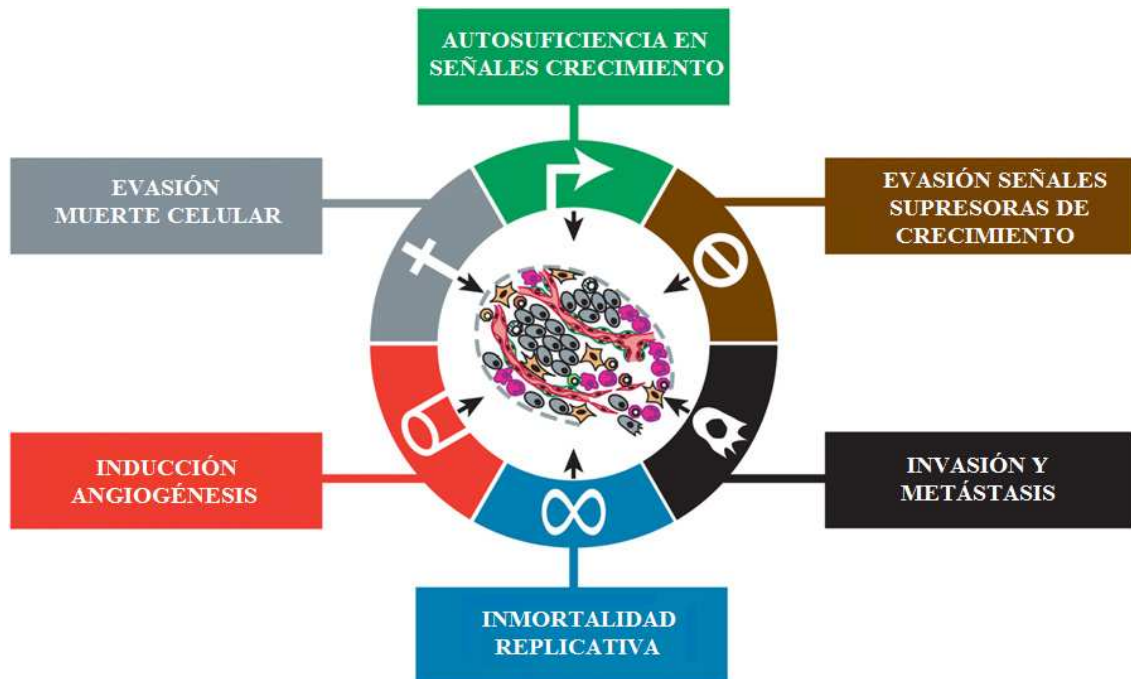
El oxígeno y los nutrientes suplementados por la sangre son cruciales para la función y supervivencia celular. Durante la carcinogénesis, las células cancerosas desarrollan la capacidad de inducir la formación de nuevos vasos sanguíneos necesarios para proporcionar los nutrientes vitales para la proliferación celular y para la eliminación de los productos de desecho celulares.

#### 5º) Capacidad de dividirse de forma ilimitada.

No solamente las señales antiproliferativas regulan el crecimiento celular. En situaciones normales, las células tienen programadas un número de veces para duplicarse, momento tras el cual entran en senescencia. Esta limitación del número de divisiones está registrada en los cromosomas. El final de los cromosomas, telómeros, está compuesto por varios miles de repeticiones de una corta secuencia de 6 pares de bases. Durante la división celular, se pierden entre 50-100 pares de bases de los telómeros. Este progresivo acortamiento se ha asociado a la incapacidad de las ADN polimerasas para replicar completamente el final 3' de los cromosomas durante la fase S. Esta progresiva pérdida de los telómeros durante los sucesivos ciclos de replicación finalmente tiene como consecuencia la pérdida de los telómeros, quedando el ADN desprotegido. En condiciones normales, esta pérdida de los telómeros hace que las células paren la proliferación entrando en un estado de senescencia. Sin embargo, las células cancerosas expresan elevados niveles de telomerasas, enzimas encargadas de añadir repeticiones de 6 pares de bases al final del ADN telomérico, manteniendo la integridad de los telómeros. También desarrollan otros mecanismos para mantener la integridad de los telómeros, como el intercambio intercromosómico mediante recombinación. De esta manera, las células cancerosas pueden mantener los telómeros y con ello, la capacidad de dividirse de forma ilimitada.

6º) Capacidad para invadir tejidos adyacentes y migrar a través de la sangre o linfa a otros órganos y tejidos (metástasis).

Las células cancerosas desarrollan la habilidad de producir cambios en el microambiente que les rodea. Entre los cambios que producen, destaca la elevada expresión de proteasas que van a degradar la matriz extracelular, facilitando la migración de las células a vasos sanguíneos o linfáticos cercanos. Una vez en el torrente sanguíneo o en la linfa, las células cancerosas pueden llegar a cualquier parte del organismo, pudiendo establecerse en un órgano o tejido, dando lugar a un nuevo tumor. A este estado se le conoce como metástasis y es la causa principal de la muerte producida por cáncer.



*Figura 1. Habilidades adquiridas por células cancerosas. Figura adaptada del artículo “The Hallmarks of Cancer”<sup>7</sup>.*

Como se ha comentado anteriormente, el proceso para poder adquirir todas estas habilidades de las células cancerosas es un proceso que suele necesitar años. Este es el motivo por el cual el cáncer suele ser más frecuente en adultos de mediana edad y mayores. El crecimiento de la población y la mayor longevidad están conduciendo a un rápido aumento en el número total de adultos de mediana edad y ancianos, con el correspondiente aumento de nuevos casos de cáncer. Según el informe GLOBOCAN 2008 elaborado por la Agencia Internacional de Investigación en Cáncer, en el 2008 hubo aproximadamente 12,7 millones de nuevos casos de cáncer diagnosticados y 7,6 millones de muertes debidas a cáncer<sup>8</sup>. Esta cifra de muertes causadas por cáncer correspondió al 13,3% del total de defunciones ocurridas en el mundo durante el 2008. Esto convierte al cáncer en la tercera causa de muerte en el mundo (Figura 2) y en la segunda causa de muerte por enfermedades no transmisibles, después de las enfermedades cardiovasculares (30,5%)<sup>9,10</sup>.

La incidencia y mortalidad de cáncer en España no son muy distintas a las globales. En el informe elaborado por la OMS sobre las causas de defunciones en España en el 2002, el cáncer fue la causa del 24,4% de las defunciones totales (Figura 3), convirtiéndolo en la segunda causa de muerte en España<sup>11</sup>. Esta situación no ha cambiado demasiado con los años, estimándose que el cáncer fue el responsable del 27% de las defunciones totales ocurridas en España durante el 2007<sup>12</sup>. Cabe destacar que en ese año, el cáncer fue la primera causa de muerte en varones con

### 3. ANTECEDENTES

el 31% de las defunciones totales y la segunda causa de muerte en mujeres con el 26% de las defunciones totales. La predicción para el futuro es que la incidencia y mortalidad de cáncer en España continúe siendo elevada, estimándose que en el 2015 se diagnosticarán más de 220000 nuevos casos de cáncer. Estos datos indican que uno de cada tres varones y una de cada cuatro mujeres serán diagnosticados de cáncer a lo largo de su vida en España.

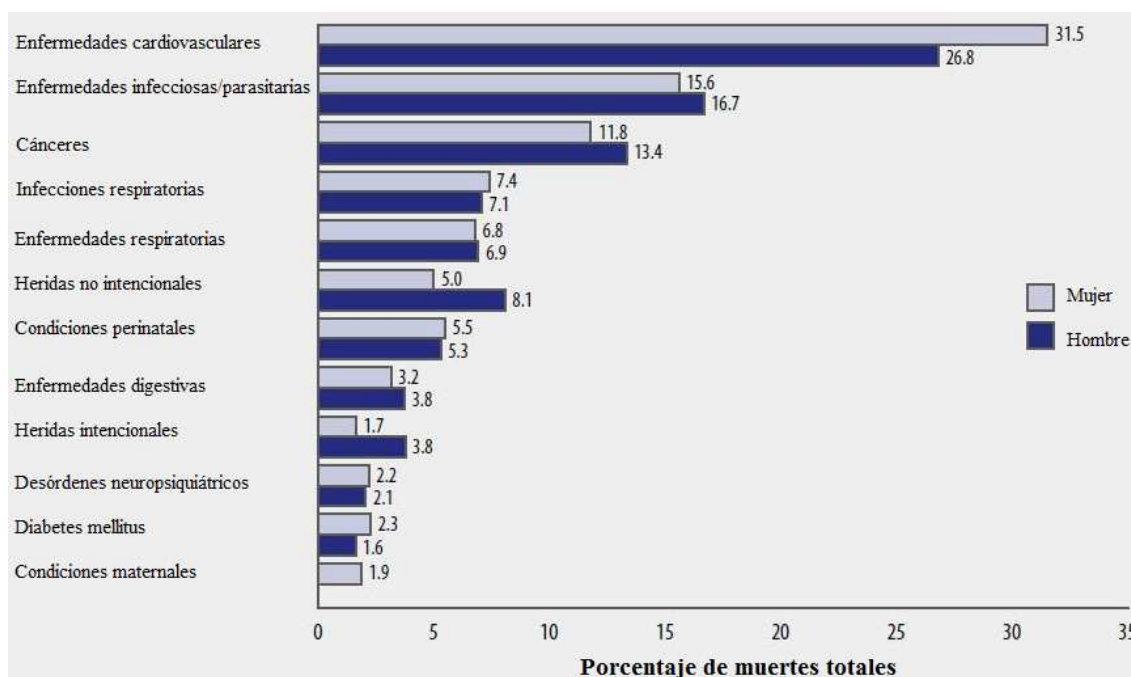


Figura 2. Distribución de defunciones por causas, hombres y mujeres, a nivel mundial. Adaptada del artículo "The Global burden of disease 2004 update"<sup>9</sup>.

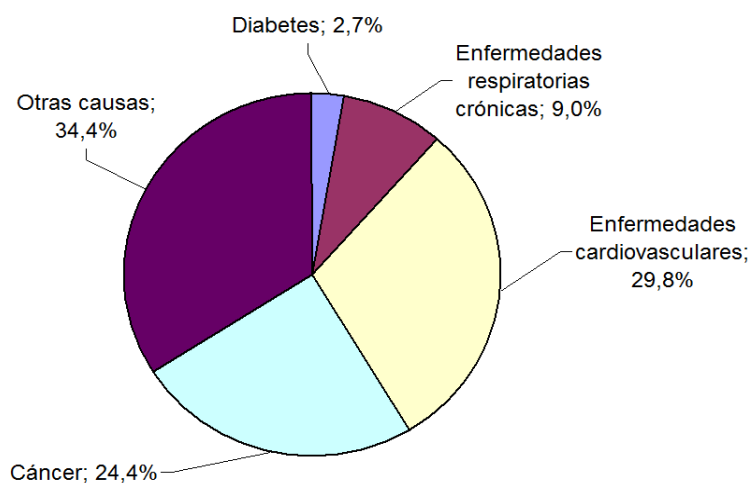


Figura 3. Muerte por causas, todas las edades, España, 2002. Adaptado del artículo "The Impact of Chronic Disease in Spain"<sup>11</sup>.

### 3. ANTECEDENTES

Estas elevadas tasas de mortalidad se deben a que en el momento del diagnóstico, la mayoría de los cánceres se encuentran en un estado muy avanzado. En este estado, la terapia actual no es suficientemente efectiva, siendo necesaria la búsqueda de tratamientos más efectivos.

Teniendo en cuenta el total de muertes causadas por cada tipo de cáncer, es el cáncer de pulmón el líder de las defunciones por cáncer, siendo el causante del 18,2 % de las muertes debidas a cáncer y del 2,3% del total de defunciones estimadas ocurridas en el mundo durante el 2008<sup>9</sup>. Estas cifras dejan claro que el cáncer de pulmón es un grave problema de salud que no se ha podido resolver con la terapia actual, siendo necesaria la búsqueda de tratamientos más efectivos para el cáncer de pulmón.

#### 3.2. EL CÁNCER DE PULMÓN. NECESIDAD DE FÁRMACOS ANTICANCEROSOS SELECTIVOS.

El cáncer de pulmón se origina en los tejidos de las vías respiratorias, al producirse la transformación maligna de células que forman parte del epitelio del árbol respiratorio, desde la tráquea a los alvéolos pulmonares. Las causas de esta transformación maligna pueden ser difíciles de establecer pero se conoce una serie de factores de riesgo (controlables o no) que aumentan la probabilidad de padecer cáncer de pulmón<sup>2,3</sup>. Entre los factores de riesgo controlables se encuentran:

- \* El tabaco: es el factor de riesgo más importante de cáncer de pulmón. La gran mayoría de los cánceres de pulmón diagnosticados se produce en personas fumadoras, ya sea de forma activa o pasiva. Es el factor principal a evitar para disminuir el riesgo de padecer cáncer de pulmón.

- \* Radón: es un gas radiactivo invisible, inodoro e insaboro presente de forma natural en ciertos suelos y rocas, por lo que se puede encontrar en el material de construcción de casas. La exposición a este gas se ha visto asociada a un aumento del riesgo de cáncer de pulmón, al ser el pulmón el principal órgano dañado por este gas. Los mineros son el principal grupo de riesgo debido a la exposición a este gas durante su trabajo.

- \* Asbesto: es un mineral que a menudo es utilizado en la construcción. Personas expuestas a él (mineros, constructores navales, etc.) tienen un mayor riesgo de padecer cáncer de pulmón.

La prevención de la exposición a estos factores de riesgo disminuye el riesgo a padecer cáncer.

### 3. ANTECEDENTES

Entre los factores de riesgo no controlables destacan los antecedentes familiares de cáncer de pulmón y el haber padecido enfermedades crónicas del pulmón como la tuberculosis o bronquitis.

En el caso de producirse el cáncer, su detección precoz puede aumentar su pronóstico favorable. Sin embargo, en la actualidad no existe ninguna prueba eficaz y no invasiva de detección precoz para el cáncer de pulmón. Esta falta de métodos para la detección precoz junto con la falta de síntomas durante el inicio del cáncer, es lo que hace que la gran mayoría de los pacientes con cáncer de pulmón sean diagnosticados cuando el cáncer está muy avanzado. Los síntomas y signos suelen aparecer en un estado avanzado como resultado de la invasión local primaria o una compresión de estructuras torácicas adyacentes. Cuando un tumor pulmonar adquiere un tamaño que comienza a interferir con las estructuras cercanas o a generar líquidos que se acumulan en el pulmón o alrededores, se va a obstaculizar el intercambio de oxígeno y dióxido de carbono en los pulmones, que será lo que origine los posibles síntomas por cáncer de pulmón: cansancio, tos con o sin sangre, disnea y dolor. Por otra parte, el tumor puede comprimir estructuras torácicas adyacentes como el esófago, los nervios de la laringe o la vena cava superior, originando disfagia, irritación de la garganta y edema facial dependiendo de la zona afectada. Estos síntomas son muy inespecíficos porque otras patologías también pueden originarlos. También pueden aparecer síntomas debidos a metástasis, destacando defectos neurológicos y cambios en la personalidad debido a metástasis cerebral o dolores óseos debido a metástasis ósea. La presencia de estos síntomas junto con la exposición a los factores de riesgos comentados anteriormente, pueden hacer sospechar la posible presencia de cáncer de pulmón. Para poder confirmar si se trata de cáncer de pulmón, lo primero que se realiza es el diagnóstico clínico mediante la historia clínica y exploración física del paciente, acompañado de pruebas diagnósticas como analíticas, radiografías de tórax y tomografía computarizada. Sin embargo, la única forma de realizar un correcto diagnóstico de cáncer de pulmón es mediante una biopsia para el análisis en ella de la presencia de células cancerosas por un patólogo. Esta biopsia puede realizarse mediante una citología del esputo (análisis del esputo recogido tras inducir la tos), toracentesis (análisis del líquido pleural), broncoscopia (examen de las vías respiratorias con un broncoscopio y análisis de las muestras tomadas), punción transtorácica (análisis del tejido pulmonar o líquido pleural tomado mediante la punción con una aguja del posible tumor detectado mediante una radiografía), toracentesis (inyección de líquido en un área entre el pulmón y la pared torácica para su posterior recuperación y análisis), toracoscopia (observación de los pulmones mediante una cámara especial insertada a través de incisiones pequeñas en el pecho del paciente), toracotomía (estudio directo del pulmón mediante cirugía) o mediastinoscopia (análisis de los ganglios linfáticos en el centro del tórax mediante una pequeña incisión en el esternón). Tras la toma de la biopsia, se realiza su estudio microscópico para

### 3. ANTECEDENTES

verificar la presencia de células cancerosas. Este estudio permite clasificar el cáncer de pulmón teniendo en cuenta el aspecto de las células en:

- \* Cáncer de pulmón de células pequeñas (CPCP): presenta células cancerosas muy pequeñas, de forma ovalada que presentan un ritmo de proliferación elevado y una gran capacidad de invadir otros órganos del cuerpo.

- \* Cáncer de pulmón de células no pequeñas (CPCNP): presenta células de mayor tamaño y de menor capacidad invasiva que las células del CPCP.

El CPCNP es el tipo más común, representando el 87% de los casos de cáncer de pulmón diagnosticados. Por otro lado, el CPCNP es más resistente a la quimioterapia que CPCP. Estos dos factores hacen necesaria la búsqueda de nuevas estrategias selectivas para el tratamiento de CPCNP.

El CPCNP se origina en las células epiteliales pulmonares del bronquio central al alvéolo terminal. Dependiendo de la localización original de las células cancerosas se puede clasificar el CPCNP en los siguientes subtipos principales:

- \* Carcinoma de células escamosas: este cáncer se suele originar cerca del bronquio central y representa el 25% de los casos de CPCNP. Es el CPCNP más fuertemente relacionado con el tabaco como factor de riesgo.

- \* Adenocarcinoma: se suele originar en el tejido periférico del pulmón y representa el 40% de los casos de CPCNP. Suele presentar una gran heterogeneidad histológica. La línea celular A549 (utilizadas en este trabajo) derivan de un paciente con este tipo de cáncer.

- \* Carcinoma de células grandes: suele empezar en el tejido periférico del pulmón y representa el 10% de los casos de CPCNP.

- \* Existen numerosos subtipos adicionales a estos tres anteriores, pero su frecuencia es muy reducida, llegando solamente al 5% de los casos de CPCNP en total.

Una vez que se ha clasificado el tipo de cáncer de pulmón, se continúa con el diagnóstico porque es necesario establecer cuál es la etapa o estadio de la enfermedad. La estadificación es una manera de describir el cáncer, analizando dónde se encuentra ubicado y si se ha diseminado a otras partes del cuerpo. El conocimiento del estadio es fundamental para poder establecer cuál es el mejor tratamiento y para predecir el pronóstico del paciente. Generalmente, un estadio más bajo es asociado con mejores resultados clínicos. Para la estadificación puede ser necesario realizar otras pruebas adicionales a las comentadas anteriormente, como son:

- \* Tomografía computarizada (TAC): esta prueba produce imágenes que permite detectar la localización de los tumores en el pulmón y/o las metástasis del cáncer pulmonar.



### 3. ANTECEDENTES

\* Resonancia Magnética Nuclear (RMN): este examen produce imágenes detalladas de un tejido mediante el uso de un imán, permitiendo observar la localización de los tumores en un tejido.

\* Gammagrafía ósea: esta prueba se basa en el uso de un marcador radiactivo que se acumulará en los huesos que se encuentren dañados por la presencia de una metástasis ósea.

\* Tomografía por emisión de positrones (PET): esta prueba está basada en el hecho de que las células cancerosas presentan mayor consumo de glucosa que las células normales. Mediante la utilización de glucosa marcada con un isótopo radiactivo, se consigue elaborar imágenes computarizadas en donde se pueden observar los tumores debido a su mayor rapidez para consumir dicho azúcar.

Con todas estas pruebas adicionales junto con los datos obtenidos con las pruebas iniciales que fueron comentadas anteriormente, se realiza la clasificación del CPCNP siguiendo el sistema de clasificación TNM creado por Pierre Denoix en 1944. Este sistema permite clasificar el estadio de un cáncer para realizar el pronóstico del paciente, permitiendo establecer el tratamiento terapéutico más adecuado para el paciente y valorando la posible supervivencia del paciente según la extensión inicial del tumor. El sistema TNM se basa en la evaluación de tres parámetros con todos los datos obtenidos mediante las pruebas clínicas realizadas al paciente. Estos 3 parámetros o categorías son: la extensión/tamaño del tumor primario (T), la ausencia o presencia de metástasis en los ganglios regionales (N) y la ausencia o presencia de metástasis a distancia (M). El cáncer es clasificado según las características que presente para cada una de estas categorías. De esta forma, con estos 3 parámetros se puede establecer la estadificación, que en el caso de CPNCP es la siguiente:

\* Estadio oculto: las células cancerosas son detectadas en el esputo o líquido procedentes de lavados bronquiales durante la broncoscopia pero, sin embargo, no se observa ningún tumor en el pulmón.

\* Estadio 0: Las células cancerosas son localizadas solamente en la capa de células más internas del pulmón. También se le puede denominar carcinoma in situ o cáncer no invasor.

\* Estadio I: las células cancerosas han crecido a través del revestimiento más interno del pulmón hacia el tejido más profundo del mismo, pero no han llegado a invadir los ganglios linfáticos vecinos. Si el tumor es menor de 3 cm es estadio IA, pero si es mayor de 3 cm, ha invadido el bronquio principal y la pleura se considera estadio IB. En ambos estadios es posible la cirugía completa del tumor.

\* Estadio II: Se diferencia del estadio I en que las células cancerosas sí han invadido los ganglios linfáticos vecinos o algún otro tejido. Si el tamaño del tumor es menor de 3 cm es estadio IIA, pero si es mayor de 3cm y ha invadido ganglios linfáticos vecinos, pleura,

### 3. ANTECEDENTES

diafragma, bronquio principal o el tejido que rodea al corazón se denomina estadio IIB. En ambos estadios es posible la cirugía completa del tumor.

\* Estadío III: en este estadio el tumor puede tener cualquier tamaño pero ha invadido otros tejidos adyacentes distintos de los mencionados en el estadio II, por lo que es muy difícil su extirpación completa mediante cirugía. Se clasifica en:

- Estadío IIIA: las células cancerosas han invadido los ganglios linfáticos en el centro del tórax pero en el mismo lado del pulmón en el que se originó.

- Estadío IIIB: las células cancerosas han invadido los ganglios linfáticos del lado opuesto del tórax, pudiendo también haber invadido estructuras cercanas al tórax como vasos sanguíneos, vértebras, esófago o corazón.

\* Estadío IV: las células cancerosas se han diseminado por distintos lóbulos del mismo pulmón o por el otro pulmón o pueden encontrarse en otras partes del cuerpo, formando lo que se conoce como tumor metastásico. El cáncer de pulmón se disemina con mayor frecuencia al cerebro, los huesos, el hígado y las glándulas suprarrenales. Las células de los nuevos tumores son del mismo tipo celular que las del tumor original y, por tanto, han de ser tratadas del mismo modo.

Una vez clasificado el estadio de cáncer que presenta el paciente y teniendo en cuenta el estado de salud general del paciente, es posible iniciar el tratamiento. El CPCNP puede ser tratado mediante cirugía, radioterapia, quimioterapia o terapia dirigida. La combinación de estos tratamientos suele ser muy frecuente. La cirugía y la radioterapia son terapias locales porque van a ir enfocadas a destruir un cáncer localizado en una zona concreta del organismo. Mientras que la quimioterapia y la terapia dirigida son tratamientos sistémicos porque se basan en la utilización de fármacos que pueden llegar al torrente sanguíneo y afectar a células cancerosas que estén diseminadas por el organismo.

La cirugía intenta la eliminación del tumor mediante su extirpación total junto con la de los ganglios linfáticos cercanos al tórax. La extirpación puede ser desde una pequeña parte del pulmón hasta un pulmón entero. Se ha comprobado que la extirpación del lóbulo pulmonar en su totalidad es el tipo de cirugía más eficaz. El periodo de recuperación después de una cirugía de pulmón va a depender de la cantidad extirpada de pulmón y del estado del paciente antes de someterse a ella. No es útil cuando el cáncer está diseminado por el cuerpo.

La radioterapia consiste en el uso de rayos de alta energía dirigidos a destruir las células cancerosas. En el cáncer de pulmón suele ser radiación externa y se realiza mediante ciclos de radiación de días. Los efectos secundarios van a depender de la dosis de radiación y de las zonas

### 3. ANTECEDENTES

irradiadas. Los más comunes son: dificultad al tragar, piel irritada, fiebre, tos, etc. Por eso es importante que la radiación se dirija a reducir al mínimo la extensión de tejido pulmonar normal expuesto.

La quimioterapia se basa en el uso de medicamentos para la destrucción de las células cancerosas, las cuales pueden estar localizadas en cualquier parte del cuerpo. Estos medicamentos suelen ser administrados por vía intravenosa, diseminándose por todo el organismo a través del torrente sanguíneo. Se suele administrar por ciclos que dependerán del fármaco utilizado. Los agentes anticancerosos usados actualmente actúan sobre células con alto ritmo de proliferación, como son las células cancerosas. Sin embargo, las células cancerosas no son las únicas células con elevado ritmo proliferativo sino que existen células normales que también se dividen rápidamente como son los linfocitos, células en las raíces del pelo, células del epitelio digestivo, etc., que también se ven afectadas por estos fármacos. Esto explica la mayoría de los efectos secundarios provocados por la quimioterapia como pueden ser infecciones por la depresión del sistema inmune, anemias, vómitos, diarreas, pérdida del pelo, etc. Algunos de estos síntomas pueden ser paliados mediante el uso de otros medicamentos como los antieméticos. En la quimioterapia del CPCNP los fármacos anticancerosos más utilizados son cisplatino y carboplatino que suelen combinarse con gemcitabina, paclitaxel, docetaxel, vinorelbina, irinotecan y pemetrexed.

En los últimos años, el estudio comparativo de tejidos cancerosos y no cancerosos ha revelado que las células cancerosas tienen diferencias (por ejemplo en la expresión y niveles de proteínas) respecto a las células no cancerosas. Se conocen con el nombre de terapias dirigidas a las terapias que pretenden explotar estas diferencias con el fin de matar o inhibir el crecimiento de las células cancerosas afectando lo menos posible a las células no cancerosas. Los principales fármacos que se incluyen en estas terapias son los inhibidores de proteínas kinasas y los anticuerpos monoclonales. Dentro de este tipo de terapias destaca el uso del anticuerpo monoclonal bevacizumab con actividad antiangiogénica para el tratamiento de determinados carcinomas escamosos. Otro ejemplo es el erlotinib que es un inhibidor de la tirosina-quinasa del receptor del factor de crecimiento epidérmico humano tipo 1 (EGFR), el cual está involucrado en el crecimiento y propagación de determinados tipos de tumores.

Como se ha comentado anteriormente la utilización de una terapia u otra dependerá del estadio del cáncer y del protocolo establecido en el hospital de diagnóstico y tratamiento del paciente. Seguidamente se comenta de forma breve los tratamientos más frecuentes dependiendo del estadio del cáncer:

\* Estadio oculto y estadio 0: no se suele realizar tratamiento, simplemente un seguimiento mediante broncoscopia de la evolución del tumor. En algunos casos se llega a cirugía.

### 3. ANTECEDENTES

\* Estadio I: en general se trata con cirugía acompañada en ocasiones con radioterapia. En algunos casos se llega a tratar con radiofrecuencia, que consiste en el uso de ultrasonidos a través de un vector que se introduce en el tumor. No se suele recomendar el uso de quimioterapia en este estadio.

\* Estadio II: el tratamiento de primera elección es la cirugía del tumor y los ganglios cercanos. Esta cirugía puede ir acompañada por quimioterapia preoperatoria y postoperatoria con cisplatino, combinado o no con vinorelbina. La radioterapia solamente se utiliza en el caso de intolerancia a la cirugía.

\* Estadio III: en este estadio la cirugía y la radioterapia por sí solas no son efectivas puesto que las células cancerosas se encuentran más diseminadas. Por esa razón, como primera elección los pacientes reciben quimioterapia y como adyuvante reciben cirugía y/o radioterapia (secuencial o simultánea).

\* Estadio IV: debido a la diseminación de las células cancerosas por todo el organismo, la cirugía y la radioterapia son, generalmente, inútiles en este estadio. El tratamiento de primera elección es la quimioterapia con un compuesto de platino (cisplatino o carboplatino) combinado con un segundo fármaco antitumoral (docetaxel, paclitaxel, gemcitabina, vinorelbina o pemetrexed). Rara vez la quimioterapia puede lograr eliminar a todas las células cancerosas, por lo que el principal objetivo consiste en aumentar la supervivencia y mejorar la calidad de vida del paciente. En muchas ocasiones, los medicamentos utilizados son cambiados por otros de distinto mecanismos para intentar mejorar el estado del paciente, ya sea por los efectos secundarios o por la baja efectividad de los fármacos. Actualmente, se ha comenzado a utilizar la terapia dirigida sola o en combinación con la quimioterapia para tratar cánceres con una histología determinada.

A pesar de la existencia de todas estas estrategias terapéuticas, la mayoría de los pacientes no suelen superar los 5 años de vida desde el momento del diagnóstico del cáncer de pulmón. Esto se debe a que en el momento del diagnóstico, la gran mayoría de los pacientes presentan cáncer de pulmón en estadio IIIB/IV. En estos estadios la supervivencia más de 5 años desde el diagnóstico es de solamente un 3-15% de los pacientes debido a que los tratamientos actuales no son lo suficientemente efectivos para erradicar completamente las células tumorales, las cuales en esos estadios se encuentran diseminadas por el organismo. En EEUU se estima que durante el 2013 serán diagnosticados más de 1,5 millones de nuevos casos de cáncer, de los cuales el 14% serán cáncer de pulmón<sup>13</sup>. Aproximadamente, de los diagnosticados con cáncer de pulmón, el 56% presentará estadios avanzados (III/IV) y, de éstos, solamente un 4% sobrevivirá más de 5 años desde el momento del diagnóstico (Figura 4).

### 3. ANTECEDENTES

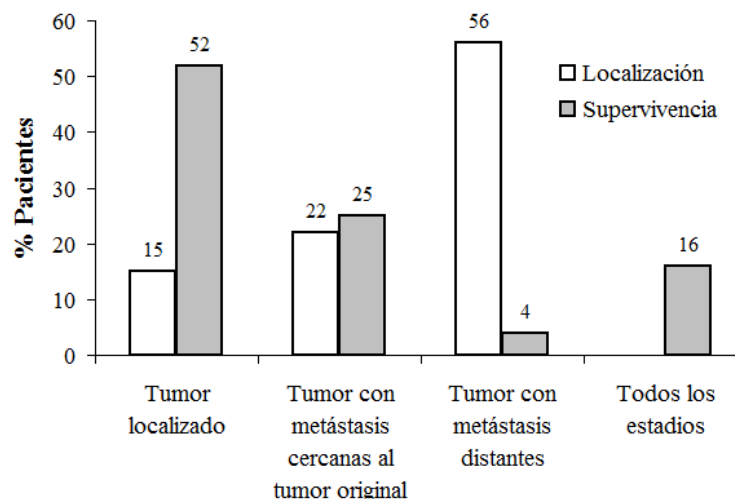


Figura 4. Localización del tumor y posibilidad de sobrevivir más de 5 años tras el diagnóstico. Datos estimados en EEUU para el 2013. Gráfica elaborada con los datos obtenidos del artículo “Cancer Stadistic, 2013”<sup>13</sup>.

En España la situación no se diferencia mucho con respecto a EEUU. La posibilidad de sobrevivir más de 5 años tras el diagnóstico de cáncer de pulmón no supera el 11% de los pacientes y está cifra no se diferencia mucho con respecto a la encontrada en el resto de Europa según los datos estadísticos disponibles hasta el momento (Figura 5). Como se ha comentado anteriormente, el cáncer es la segunda causa de defunción en España y se estima que en el 2015 sean diagnosticados más de 220000 nuevos casos de cáncer de los cuales el 10% serán cáncer de pulmón. Todos estos datos dejan claro la necesidad de la búsqueda de nuevos fármacos que sean más selectivos hacia células cancerosas para poder eliminarlas cuando se encuentran diseminadas por el organismo (metástasis).

### 3. ANTECEDENTES

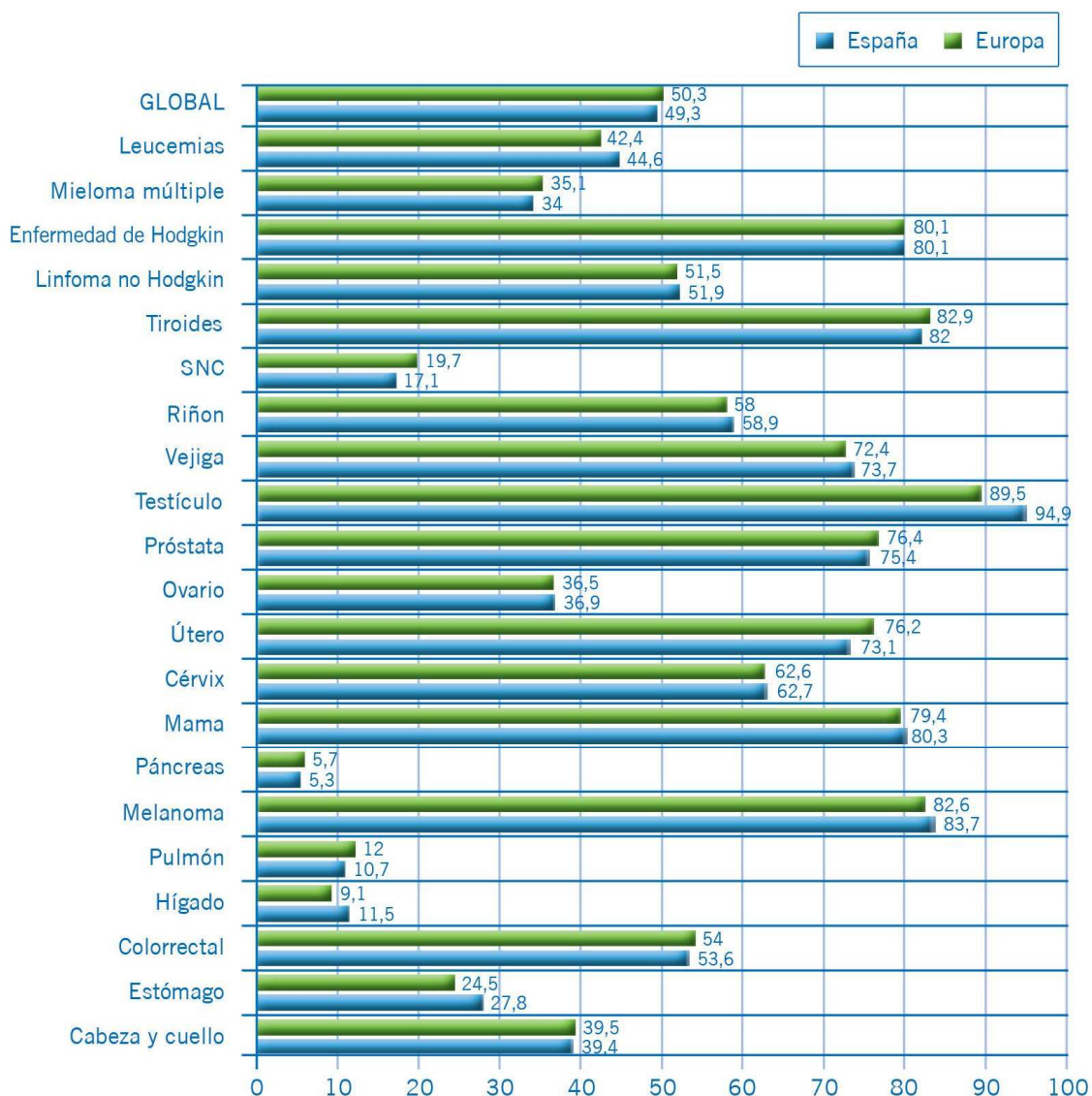


Figura 5. Supervivencia más de 5 años desde el diagnóstico (1995-1999) de cáncer en Europa y España. Gráfica adaptada desde informe elaborado por la SEOM<sup>12</sup>.

#### 3.3. POSIBLES ESTRATEGIAS PARA EL DESARROLLO DE FÁRMACOS ANTICANCEROSOS SELECTIVOS.

Como se ha comentado anteriormente, el elevado número de defunciones debidas a cáncer ocurridas cada año en el mundo deja de manifiesto la falta de efectividad de los tratamientos actuales anticancerosos. Por un lado, la cirugía y la radioterapia solamente son útiles cuando las células tumorales se encuentran localizadas en una zona muy concreta. Por otro lado, la quimioterapia y las terapias dirigidas utilizadas en casos de diseminación de los tumores fallan debido a la falta de selectividad por células cancerosas y/o al desarrollo de resistencias.

### 3. ANTECEDENTES

Hasta el momento, la mayoría de los antineoplásicos utilizados en terapéutica tienen acción antiproliferativa, es decir, actúan en la división celular. Por lo tanto, afectan a células que se estén dividiendo, especialmente si lo hacen a un ritmo acelerado como es en el caso de las células cancerosas. La mayoría de estos fármacos van a causar la muerte celular mediante la generación de daño en el ADN, como es el caso de los agentes alquilantes, los antibióticos citotóxicos, los venenos de topoisomerasas y los antimetabolitos. Aunque la base para la actividad selectiva anticancerosa de estos fármacos que atacan el ADN aún está escasamente entendida<sup>6</sup>, se piensa que la elevada inestabilidad genética de las células cancerosas podría explicar el por qué células tumorales son a menudo más vulnerables que células normales a estos fármacos<sup>14,15</sup>. Sin embargo, los fármacos antineoplásicos actuales no solamente afectan a células cancerosas, sino que también afectan a células normales con elevado ritmo proliferativo (como las células del sistema inmune), siendo la causa de sus efectos adversos (Figura 6). Esta falta de selectividad hace que las dosis de los fármacos antineoplásicos deban reducirse hasta niveles que no son suficientemente efectivos.

Como se ha comentado anteriormente, la mayoría de los fármacos anticancerosos actúan dañando el ADN, de forma directa o indirecta (Figura 7), para lo cual necesitan que las células se encuentren dividiéndose. Por otro lado, al afectar solamente a células en estado de división, hace que estos fármacos no sean capaces de actuar sobre células cancerosas que se encuentran en fase G0 o G1 (fases de reposo replicativo), siendo uno de los motivos de resistencia a estos fármacos, debido a que no todas las células de un tumor se encuentran en fase replicativa. Otro motivo de resistencia es la existencia de mecanismos celulares que reparan el daño en el ADN generado por los fármacos antineoplásicos, disminuyendo el efecto tóxico de estos fármacos. En los últimos años, estos mecanismos de reparación del daño en el ADN están siendo considerados como una posible diana terapéutica en la lucha contra el cáncer.

### 3. ANTECEDENTES

	Común a muchos fármacos	Se aprecia preferentemente con uno o dos fármacos
1. <i>Inmediata</i> (comienzo en horas-días)	Náuseas y vómitos Necrosis tisular local Flebitis Hiperuricemia Insuficiencia renal Anafilaxia Erupción cutánea	Cistitis hemorrágica (ciclofosfamida e ifosfamida) Hipocalcemia (mitramicina) Rubefacción facial (mitramicina) Reacción de recuerdo radioterápico (dactinomicina) Fiebre/escalofríos (bleomicina e interferón)
2. <i>Temprana</i> (comienzo en días-semanas)	Leucopenia Trombocitopenia Alopecia Estomatitis Diarrea Megaloblastosis	Íleo paralítico (vincristina) Hipercalcemia (estrógenos) Psicosis (corticoides) Coagulación intravascular (asparaginasa) Retención líquida (estrógenos y corticoides) Síndrome griposo (dacarbazina) Infiltrados pulmonares (metotrexato y bleomicina) Ataxia cerebelosa (5-fluorouracilo) Ototoxicidad (cisplatino)
3. <i>Diferida</i> (comienzo en semanas-meses)	Anemia Aspermia Lesión hepatocelular Hiperpigmentación Fibrosis pulmonar	Neuropatía periférica (vincristina) Necrosis cardíaca (adriamicina y ciclofosfamida) Estreñimiento (vincristina) Síndrome de Cushing (corticoides) Masculinización (andrógenos) Feminización (estrógenos) Ictericia colestásica (mercaptopurina) Síndrome addisoniano (aminoglutetimida y busulfano)
4. <i>Tardía</i> (comienzo en meses-años)	Esterilidad Hipogonadismo Carcinogénesis Leucemia aguda Linfomas Tumores sólidos Otras malignizaciones secundarias	Fibrosis hepática (metotrexato) Encefalopatía (metotrexato y radiación del SNC) Carcinoma de vejiga (ciclofosfamida) Osteoporosis (corticoides)

Figura 6. Principales efectos adversos producidos por los fármacos antineoplásicos utilizados en terapéutica. Fuente original: Farmacología Humana<sup>16</sup>.



### 3. ANTECEDENTES

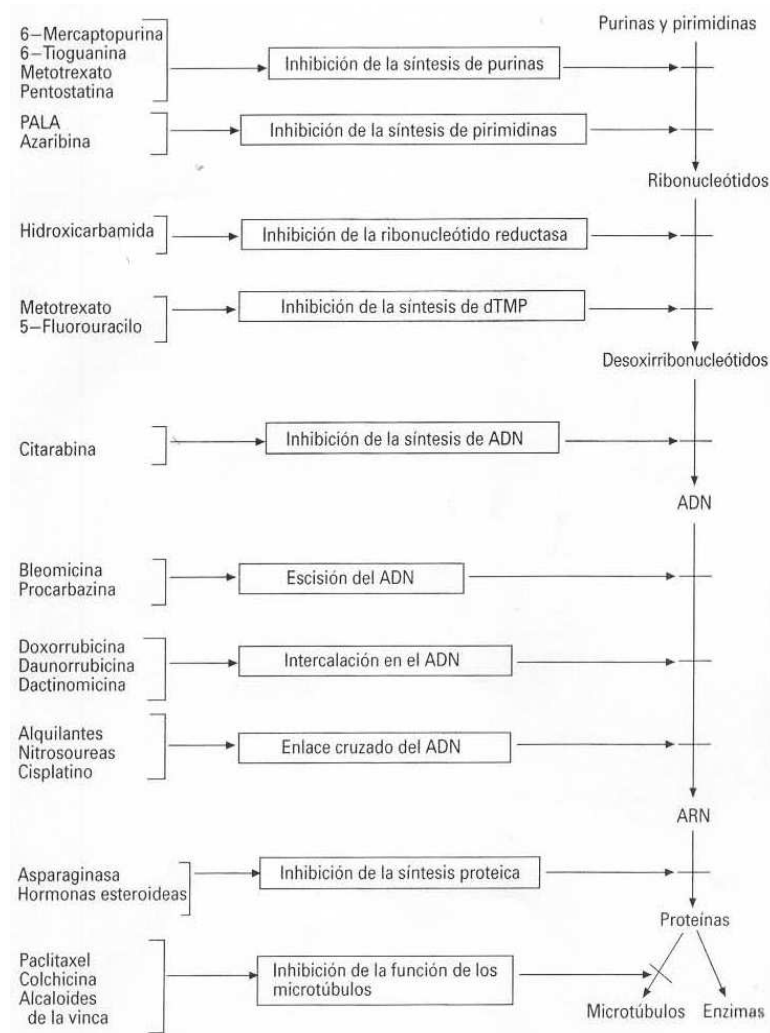


Figura 7. Lugar y mecanismo de acción de algunos de los fármacos anticancerígenos utilizados en terapéutica. Fuente original: Farmacología fundamental<sup>17</sup>.

Por otra parte, el motivo de la utilización de fármacos que dañan el ADN para el tratamiento del cáncer se debe a que hasta el momento siempre se ha considerado a las células cancerosas como células con una gran inestabilidad genética. Durante el siglo XX, la investigación del cáncer ha estado basada fundamentalmente en la teoría de las mutaciones (“somatic mutation theory of cancer”). Esta teoría postula que el cáncer se produce por la adquisición de mutaciones en tres tipos de genes: oncogenes, genes supresores de tumores y genes reparadores de ADN. Según esta teoría, el cáncer puede curarse corrigiendo estas mutaciones o aprovechando estos defectos genéticos para eliminar las células cancerosas<sup>6</sup>. Sin embargo, el alto número de genes implicados en el cáncer y la alta variabilidad genética de las células tumorales dificultan enormemente la búsqueda de terapias encaminadas a corregir o aprovechar estas alteraciones genéticas para eliminar células cancerosas. Actualmente está reconocido que es extremadamente difícil corregir el daño genético de las células tumorales.

### 3. ANTECEDENTES

También está reconocido que, aunque es posible utilizar las alteraciones genéticas de las células cancerosas para desarrollar nuevos fármacos, el uso de estos fármacos está y estará restringido a un número reducido de pacientes. De hecho, cada vez está tomando más fuerza la idea de que en el futuro será necesario realizar un perfil genético de cada tipo de cáncer, e incluso de cada individuo con cáncer, para diseñar terapias personalizadas<sup>18,19</sup>. Debido a que esta investigación es un proceso largo, costoso, difícil y de aplicación restringida, se está empezando a barajar la idea de que quizás sea necesario considerar nuevas estrategias anticancerosas que no estén basadas en las alteraciones genéticas de las células tumorales<sup>20</sup>.

Por este motivo, en los últimos años las investigaciones en cáncer han empezando a buscar alteraciones que sean comunes en todos los tipos de cáncer. Fruto de estas investigaciones ha sido la adición de 2 nuevas habilidades o “huellas del cáncer” a las 6 comentadas anteriormente (Figura 8): la evasión del sistema inmune y la reprogramación del metabolismo celular<sup>4</sup>. Estas dos nuevas características son también necesarias para que las células cancerosas puedan mantener su característica fundamental, la proliferación descontrolada. El sistema inmune se encarga de eliminar elementos que sean perjudiciales para el organismo, lo que incluiría también a las células cancerosas. Sin embargo, las células cancerosas no solamente desarrollan mecanismos para evitar ser eliminadas por el sistema inmune, sino que pueden verse beneficiadas por la respuesta inflamatoria generada por el sistema inmune, estimulándose su proliferación. Por otra parte, las células cancerosas necesitan reprogramar su metabolismo celular para poder obtener la energía y precursores necesarios para mantener su elevada tasa proliferativa. Aunque algunas de las alteraciones metabólicas del cáncer se empezaron a describir a mitad del s. XX (como el efecto Warburg<sup>21</sup>), no ha sido hasta hace pocos años cuando se ha comenzado a valorar las diferencias metabólicas entre las células cancerosas y las células normales para el diseño de nuevas estrategias terapéuticas selectivas.

Otra estrategia utilizada en la búsqueda de nuevos fármacos anticancerosos selectivos es el cribado. El cribado o *screening* consiste en testar colecciones de compuestos químicos o productos naturales, con o sin relación entre ellos, para identificar moléculas con una determinada actividad biológica. Ejemplos de fármacos resultantes de este tipo de cribado son ciertos antibióticos como las quinolonas antibacterianas<sup>22</sup>. En relación a los antineoplásicos, el cribado aleatorio se ha convertido en una útil herramienta para la identificación de nuevas cabezas de serie útiles en el tratamiento de diversos tipos de cáncer. El taxol es un ejemplo de fármaco antineoplásico introducido en terapéutica como resultado de un cribado aleatorio.

A continuación, se analizan las nuevas estrategias utilizadas durante esta tesis para la búsqueda de fármacos anticancerosos más selectivos: la utilización de los defectos en la reparación del daño en el ADN y de las alteraciones metabólicas de las células cancerosas.

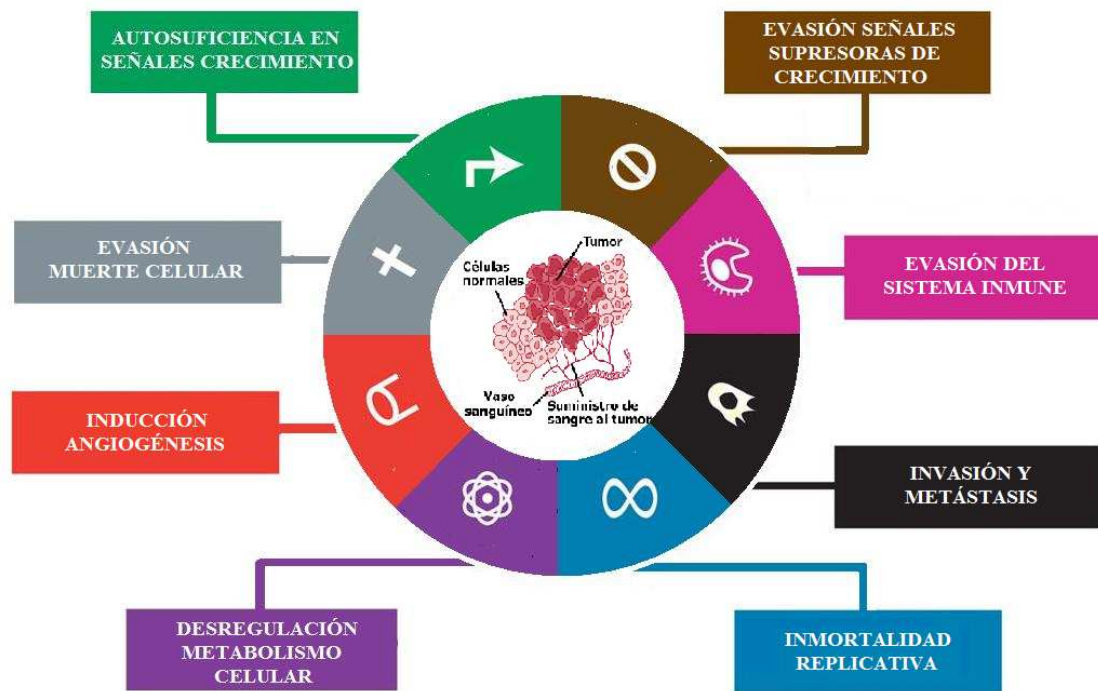


Figura 8. Habilidades de las células cancerosas. Para poder adquirir la capacidad de proliferación descontrolada, las células cancerosas deben desarrollar las características recogidas en esta figura. Adaptación del artículo “Hallmarks of cancer: the next generation”<sup>4</sup>.

#### 3.3.1. Utilización de los defectos en la reparación del daño en el ADN como nueva diana terapéutica anticancerosa.

El ADN está continuamente expuesto a una gran variedad de agentes y procesos (como carcinógenos, irradiación ionizante y ultravioleta, estrés oxidativo, errores durante la replicación, etc.) que pueden causar lesiones en él (como son lesiones oxidativas, roturas de cadenas simple o doble, aductos de ADN, etc.). Cuando se producen lesiones en el ADN se va a producir una parada del ciclo celular para permitir que las lesiones sean reparadas, evitándose de esta forma que estas lesiones pasen a las células hijas y se conviertan en mutaciones permanentes. La detección de lesiones puede ocurrir debido a que se produzca el bloqueo de la transcripción, la replicación o por sensores celulares especializados en la detección de daño en el ADN<sup>23</sup>. Estas lesiones van a intentar ser reparadas por una serie de mecanismos celulares encargados de la reparación del daño en el ADN. Cuando el daño en el ADN es imposible de reparar o es demasiado intenso, la célula puede entrar en proceso de muerte celular programada o apoptosis.

### 3. ANTECEDENTES

La variedad y frecuencia de lesiones en el ADN son compensadas por la complejidad de los mecanismos que contrarrestan estas amenazas sobre la integridad genética. Estos mecanismos son conocidos como respuestas al daño al ADN (Figura 9). La respuesta al daño al ADN está formada por un conjunto de mecanismos que actúan según el tipo de lesión, pero todos tienen en común que deben detectar la lesión, acumular factores de reparación del ADN en la lesión y, finalmente, reparar físicamente dicha lesión. La mayoría de lesiones sobre las bases nitrogenadas que forman el ADN (como lesiones oxidativas, productos de alquilación, etc.) o lesiones que originan roturas de una de las cadenas que componen el ADN suelen ser reparadas por el mecanismo de reparación por escisión de bases (BER). Cuando se produce una lesión en forma de aductos/bucles que origina una distorsión de la estructura helicoidal del ADN (como los causados por la luz ultravioleta) son reparados por la reparación por escisión de nucleótidos (NER). Si la lesión originada es una doble rotura de las hebras que componen el ADN puede ser reparado por dos vías fundamentalmente la recombinación homóloga (HR) o por la unión de extremos no homólogos (NHEJ). HR actúa principalmente durante las fases S y G2 del ciclo celular, fases en las que puede utilizar la cromátida hermana homóloga como modelo para reparar las lesiones, mientras que la NHEJ puede actuar sobre cualquier fase del ciclo celular y actúa uniendo los extremos de la lesión aunque no sean homólogos. NHEJ puede causar en ocasiones supresiones o mutaciones de secuencias de ADN, lo que puede desencadenar mutagénesis. Cabe destacar que la HR también puede reparar roturas de doble cadena como consecuencia de un fallo de reparación de roturas simples por BER. Existen otras vías de reparación como la reparación de desapareamiento de bases (MMR) que se encarga de reparar lesiones producidas por errores producidos en la secuencia de nucleótidos durante la replicación del ADN.

En los últimos años, estos mecanismos de reparación del daño en el ADN han comenzado a estudiarse como posible nueva estrategia para el desarrollo de fármacos anticancerosos selectivos. Datos recientes indican que ciertos tipos de cáncer presentan defectos en determinadas proteínas implicadas en las vías de reparación del daño en el ADN, siendo incapaces de reparar lesiones específicas en el ADN. La utilización de compuestos que generan daños específicos en el ADN podría causar la muerte de las células cancerosas que carezcan de los mecanismos necesarios para reparar estos daños específicos. Las células normales al no tener esos defectos en los mecanismos de reparación podrían reparar el daño y sobrevivir al tratamiento con esos compuestos. De hecho, existen precedentes de esta posible selectividad anticancerosa. Un ejemplo de ello es la sensibilidad a cisplatino que presentan algunos cánceres de próstata y ovario deficientes en NER. Esto se debe a que el cisplatino actúa generando enlaces o puentes cruzados entre las dos hebras del ADN, un tipo de lesión que es reparado por NER y/o HR. La deficiencia en NER en este tipo de cánceres es lo que los hace más sensibles a

### 3. ANTECEDENTES

cisplatino, al ser incapaces de reparar el tipo de daño que éste provoca. Esta deficiencia en NER también la pueden presentar algunos cánceres de pulmón de células no pequeñas, haciéndolos más sensibles al cisplatino<sup>24</sup>.

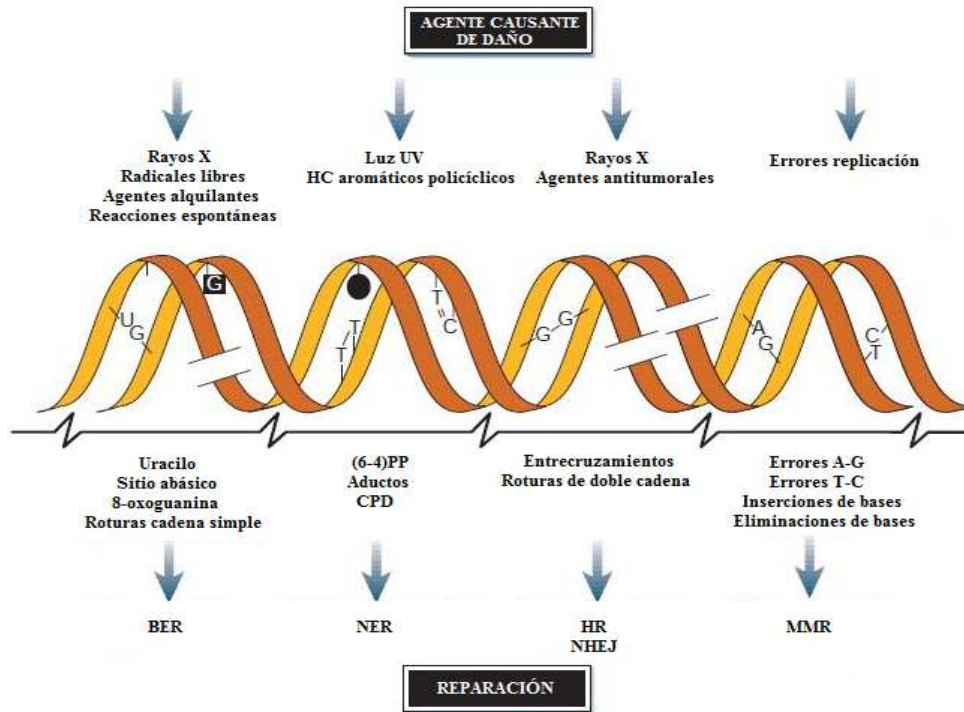


Figura 9. Principales agentes que dañan el ADN y las principales rutas de reparación que están implicadas. Fuente original: "The DNA damage response and cancer therapy"<sup>24</sup>.

Esto ha hecho que la identificación de defectos en los mecanismos de reparación de lesiones en el ADN en células tumorales y la evaluación de su influencia sobre la citotoxicidad de los agentes antineoplásicos ha llegado a ser un área de investigación en auge. Como resultado, en la última década han sido publicados cientos de artículos en los que se evalúa la influencia de los defectos en proteínas implicadas en la reparación del daño en el ADN sobre la citotoxicidad de una gran variedad de fármacos anticancerosos. Por este motivo, durante esta tesis se ha realizado la revisión titulada "*Effect of DNA repair deficiencies on the cytotoxicity of drugs used in cancer therapy-A review*", la cual se encuentra en revisión en la revista Current Cancer Drug Targets, para intentar compilar los resultados de estos artículos (ver revisión a continuación). Esta información puede proveer una visión global de cómo deficiencias en vías de reparación pueden modificar la efectividad de la quimioterapia, y puede también ayudar a la predicción de la respuestas a los antineoplásicos de los pacientes con tumores que presenten deficiencias en la reparación.

### 3. ANTECEDENTES

La principal conclusión a la que se llegó en esta revisión fue que las deficiencias en alguna de las proteínas implicadas en la reparación del daño en el ADN alteran el efecto de numerosos fármacos anticancerosos utilizados en terapéutica. De los 66 fármacos antineoplásicos de los que se disponen datos, la citotoxicidad de 60 de ellos se vio alterada en células deficientes en proteínas reparadoras del ADN específicas. Los restantes 6 fármacos (ifosfamida, valrubicina, daunorubicina, tenipósido, dexametasona y vorinostat) no se vieron afectados, posiblemente porque no han sido suficientemente estudiados. Cabe destacar que las deficiencias en proteínas implicadas en la reparación del daño en el ADN no solamente pueden alterar la citotoxicidad de fármacos cuya diana terapéutica es el ADN, sino que también la de otros fármacos cuya diana terapéutica principal no es el ADN. Esto puede ser explicado porque estos fármacos dañen el ADN de una forma indirecta o por la participación de algunas de las proteínas reparadoras del ADN en vías de supervivencia o de inducción de apoptosis por estos fármacos.

Las deficiencias específicas en proteínas o vías reparadoras del daño en el ADN pueden alterar la citotoxicidad de fármacos relacionados entre sí de forma muy distinta. Por este motivo, no se puede generalizar diciendo que las deficiencias en vías específicas de la reparación del daño en el ADN modifican la citotoxicidad de un grupo particular de fármacos anticancerosos. Aunque se ha podido obtener algunas conclusiones generales (ver revisión para mayor detalle), los resultados pueden cambiar cuando una proteína específica de la vía de la reparación del daño en el ADN o un fármaco concreto del grupo es estudiado.

Por otra parte, la información que presenta esta revisión podría ayudar a entender el mecanismo citotóxico de algunos fármacos. Por ejemplo, el principal mecanismo de los antimetabolitos es la inhibición de la síntesis de nucleótidos, pero no está claro cómo esta inhibición conduce a la muerte celular. Analizando los datos en esta revisión parece ser que las células deficientes en HR son muy sensibles a la citotoxicidad de los antimetabolitos testados, lo que puede indicar que la formación de roturas de doble cadena del ADN (la cual es reparada por HR) juega un papel importante en la actividad citotóxica de estos fármacos. La depleción de nucleótidos inducida por estos antimetabolitos podría resultar en una parada de la horquilla de replicación, que desencadenaría roturas de doble cadena que si no son reparadas, acabarían generando muerte celular.

Por otro lado, la información recopilada por esta revisión podría ayudar a la predicción de la respuesta de fármacos anticancerosos en pacientes con tumores con defectos específicos en las vías de reparación del daño en el ADN, que mejoraría la eficacia de sus tratamientos.

### **3. ANTECEDENTES**

Finalmente, esta revisión pone de manifiesto que los defectos en los mecanismos de reparación del daño en el ADN son una nueva diana terapéutica adecuada en la lucha contra el cáncer.

**Effect of DNA repair deficiencias on the cytotoxicity of drugs used in cancer therapy-A review.**

Calderón-Montaña J.M., Burgos-Morón E., Orta M.L.,  
López-Lázaro M.

Artículo en revisión en la revista Current Cancer Drug  
Targets.



# Effect of DNA repair deficiencies on the cytotoxicity of drugs used in cancer therapy – A review

José Manuel Calderón-Montaña<sup>1</sup>, Estefanía Burgos-Morón<sup>1</sup>, Manuel Luis Orta<sup>2</sup>, Miguel López-Lázaro<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>*Department of Pharmacology, Faculty of Pharmacy, University of Seville, Seville, Spain*

<sup>2</sup>*Department of Cell Biology, Faculty of Biology, University of Seville, Seville, Spain.*

## Abstract

Tumor cells often have defects in DNA repair pathways that make them vulnerable to specific DNA-damaging anticancer agents. The identification of DNA repair defects in tumor cells and the evaluation of their influence on the cytotoxicity of anticancer drugs are active areas of scientific investigation that may help rationalize and improve cancer chemotherapy. This article reviews the available data on the influence of defects in proteins involved in the major DNA repair pathways (i.e., homologous recombination, non-homologous end joining, base excision repair, nucleotide excision repair, mismatch repair, Fanconi anaemia repair, translesion synthesis and direct reversal repair) on the cytotoxicity of the FDA-approved anticancer drugs. It is shown that specific deficiencies in these DNA repair pathways alter the cytotoxicity of 60 anticancer drugs, including classical DNA-targeting drugs (e.g., alkylating agents, cytotoxic antibiotics, DNA topoisomerase inhibitors and antimetabolites) and other drugs whose primary pharmacological target is not the DNA (e.g., antimitotic agents, hormonal and targeted therapies). This information may help predict response to anticancer drugs in patients with tumors having specific DNA repair defects.

**Keywords:** DNA damage, DNA damage response, anticancer, chemotherapy

J.M. Calderón-Montaña and E. Burgos-Morón contributed equally to this work.

## Corresponding author:

Miguel López-Lázaro, PhD

Associate Professor

Department of Pharmacology, Faculty of Pharmacy, C/ Prof. García González, 2, E-41012, Seville, Spain

e-mail: mlopezlazaro@us.es

Phone: +34 954 55 63 48

## Abbreviations:

AAG: DNA-3-methyladenine glycosylase; APE1: apurinic-apyrimidinic endonuclease 1; APEX1: apurinic-apyrimidinic endonuclease 1; APNG: DNA-3-methyladenine glycosylase; *APN1p*: apurinic/apyrimidinic (AP) lyase 1; *APN2p*: apurinic/apyrimidinic (AP) lyase 2; ATM: ataxia telangiectasia mutated; ATR: ataxia telangiectasia and Rad3 related; BER: base excision repair; BLM: Bloom syndrome protein; BRCA1: : breast cancer type 1 susceptibility protein; BRCA2: breast cancer type 2 susceptibility protein; BRIP1: BRCA1-interacting protein C-terminal helicase 1; CSA/B: Cockayne syndrome A/B; CUL4A: cullin-4A; CUL4B: cullin-4B; DDB1: damage-specific DNA binding protein 1; DDB2: damage-specific DNA binding protein 2; DDR: DNA damage response; DNA-PKcs: DNA dependent protein kinase; DSB: double-strand break; ERCC1: excision repair cross-complementing rodent repair deficiency: complementation group 1; ERCC2: xeroderma pigmentosum group D-complementing protein; ERCC3: xeroderma pigmentosum group B-complementing protein; ERCC4: xeroderma pigmentosum group F-complementing protein; ERCC5: xeroderma pigmentosum group G-complementing protein; EXO1: exonuclease 1; ERCC6: Cockayne syndrome B ; ERCC8: Cockayne syndrome A; *EXO1p*: exonuclease 1; FA: Fanconi anaemia; FANC: Fanconi anaemia complementation group; FANCA: fanconi anemia group A protein; FANCB: fanconi anemia group B protein; FANCC: fanconi anemia group C protein; FANCD2: fanconi anemia group D protein isoform 2; FANCE: fanconi anemia group E protein; FANCF: fanconi anemia group F protein; FANCG: fanconi anemia group G protein; FANCH: fanconi anemia group H protein; FANCI: fanconi anemia group I protein; FANCL: fanconi anemia group L protein; FANCM: fanconi anemia group M protein; FEN1: flap structurespecific endonuclease 1; GTBP: mutS homolog 6; HHR23A: UV excision repair protein RAD23 homolog A; HR23B: UV excision repair protein RAD23 homolog B; HR: homologous recombination; Ku70: ATP-dependent DNA helicase II subunit 1; Ku80: ATP-dependent DNA helicase II subunit 2; Ku86: ATP-dependent DNA helicase II subunit 2; Lig: DNA ligase; LigIII: DNA ligase III; LigIV: DNA ligase IV; *MAG1p*: 3-methyl-adenine DNA glycosylase; MBD4: methyl-CpG-binding domain protein 4; MED1: methyl-CpG-binding domain protein 4; MGMT: O-6-methylguanine-DNA methyltransferase; *MGT1*: 6-O-methylguanine-DNA methylase; MLH1: mutL protein homolog 1; *MLH1p*: mutL protein homolog 1; MLH2: mutL protein homolog 2; *MLH2p*: mutL protein homolog 2; MPG: DNA-3-methyladenine glycosylase; *MRAD1*: mouse cell cycle checkpoint protein RAD1 ; MRE11: meiotic recombination 11; *MRE11p*: meiotic recombination 11; MRN: MRE11-RAD50-NBS1 complex; MSH: mutS homologue; MSH1: mutS homolog 1; MSH2: mutS homolog 2; MSH3: mutS homolog 3; *MSH3p*: mutS homolog 3; MSH6: mutS homolog 6; *MSH6p*: mutS homolog 6; MUS81: crossover junction endonuclease MUS81; NBN: nibrin; NBS1: nibrin; NCI: National Cancer Institute (USA); NER: nucleotide excision repair; NHEJ: non-homologous end joining; *NTGp*: DNA N-glycosylase and apurinic/apyrimidinic lyase; *NTG1p*: DNA N-glycosylase and apurinic/apyrimidinic lyase 1; *NTG2p*: DNA N-glycosylase and apurinic/apyrimidinic lyase 2; NTH: endonuclease III-like protein 1; OGG1: 8-oxoguanine DNA glycosylase; *OGG1p*: 8-oxoguanine DNA glycosylase; PARP-1: poly(ADP-ribose) polymerase 1; PARP-2: poly(ADP-ribose) polymerase 2; PCNA: proliferating cell nuclear antigen; PMS1: postmeiotic segregation increased 1; *PMS1p*: postmeiotic segregation increased 1; PMS2: postmeiotic segregation increased 2; POL: DNA polymerase; *POLbeta*: DNA polymerase beta; *Poleta*: DNA polymerase eta; *POLdelta*: DNA polymerase delta; *POLEpsilon*: DNA polymerase epsilon; *Polkappa*: DNA polymerase kappa; *Pollambda*: DNA polymerase lambda; *Polmu*: DNA polymerase mu; *Polzeta*: DNA polymerase zeta; *PPMRE11*: *Physcomitrella* meiotic recombination 11; *PPRAD50*: *Physcomitrella* DNA repair protein RAD50; RAD1: cell cycle checkpoint protein RAD1;

*RAD1p*: cell cycle checkpoint protein RAD1; RAD6: ubiquitin-conjugating enzyme E2; *RAD6p*: ubiquitin-conjugating enzyme E2; *RAD13*: *Schizosaccharomyces pombe* XPG homolog; *RAD16*: DNA repair protein RAD16; RAD18: postreplication repair protein hRAD18p; *RAD18p*: postreplication repair protein hRAD18p; RAD30: DNA polymerase eta; RAD50: DNA repair protein RAD50; RAD51: DNA repair protein RAD51 homolog 1 isoform 1; *RAD51p*: DNA repair protein RAD51 homolog 1 isoform 1; RAD52: RAD52 homolog isoform alpha; *RAD52p*: RAD52 homolog isoform alpha; RAD54: DNA repair and recombination protein RAD54; RECA: Protein RecA; REV1: DNA repair protein REV1 isoform 1; RECQL2: werner syndrome ATP-dependent helicase; *REV1p*: DNA repair protein REV1 isoform 1; REV3: DNA polymerase zeta catalytic subunit; *REV3p*: DNA polymerase zeta catalytic subunit; *RNA-II*: RNA polymerase II; ROS: reactive oxygen species; RPA: replication protein A; SNM1 homolog C: artemis; SSB: single-strand break; UDG: uracil-DNA glycosylase; UNG: uracil-DNA glycosylase; *UNG1p*: uracil-DNA glycosylase; *UVRA*: UvrABC system protein A; XLF: XRCC4-like factor; XP: xeroderma pigmentosum; XPA: xeroderma pigmentosum group A-complementing protein; XPB: xeroderma pigmentosum group B-complementing protein; XPC: xeroderma pigmentosum group C-complementing protein; XPD: xeroderma pigmentosum group D-complementing protein; XPE: xeroderma pigmentosum group E-complementing protein; XPF: xeroderma pigmentosum group F-complementing protein; XPG: xeroderma pigmentosum group G-complementing protein; XRCC: X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells; XRCC1: x-ray repair cross-complementing protein 1; XRCC2: x-ray repair cross-complementing protein 2; XRCC3: x-ray repair cross-complementing protein 3; XRCC4: x-ray repair cross-complementing protein 4; XRCC5: ATP-dependent DNA helicase II subunit 2; XRCC6: ATP-dependent DNA helicase II subunit 1; XRCC7: DNA dependent protein kinase; WRN: Werner syndrome ATP-dependent helicase.

# I. Introduction

DNA is continually exposed to a variety of agents and processes (e.g., chemical carcinogens, ultraviolet and ionizing radiation, oxidative stress, and errors in DNA replication) that cause a range of DNA lesions (e.g., single-strand breaks, double-strand breaks, oxidative lesions, DNA adducts, and base mismatches, insertions and deletions). To preserve DNA integrity, cells have evolved mechanisms to detect DNA damage, signal its presence and mediate its repair. An intact DNA damage response (DDR) is vital to prevent genetic damage and the development of associated diseases such as cancer [1, 2].

Cancer is a disease characterized by uncontrolled cell proliferation, in which genomic instability plays a crucial role. The genomic instability of cancer cells is probably the combined effect of DNA damage, DNA repair defects, and a failure to stop the cell cycle before the damaged DNA is transmitted to daughter cells. Although these processes drive genomic instability and the disease process, they also provide therapeutic opportunities [1]. Indeed, most of the drugs currently used in the treatment of cancer target the DNA of the cancer cells; examples of these drugs are alkylating agents, cytotoxic antibiotics, DNA topoisomerase poisons and antimetabolites. Although the basis for the selective anticancer activity of DNA-targeting drugs has been poorly understood for many years [3], recent evidence suggests that the elevated levels of DNA damage in tumor cells and their inability to properly repair some types of DNA damage may explain why tumor cells are often more vulnerable than normal proliferating cells to specific DNA-targeting agents [4, 5]. For example, platinum compounds induce DNA lesions that are repaired by nucleotide excision repair (NER) and homologous recombination (HR). In contrast to nearly all metastatic cancers in adults, metastatic testicular germ-cell tumors can be cured with cisplatin-based combination chemotherapy, mainly because cells from these tumors are deficient in NER and therefore have a reduced capacity to repair cisplatin-induced DNA damage [6]. Unlike these tumor cells, normal proliferating cells (which have an intact NER pathway) would repair cisplatin-induced DNA damage and would survive treatment with this drug. Platinum compounds are also useful in high grade serous ovarian cancers, which commonly have deficiencies in HR repair (BRCA1 and BRCA2), and also improve survival in patients with non-small cell lung cancers defective in NER (ERCC1) [1]

Until recently, cancers have been classified based on the anatomical site and histopathological features of the tumor, and treatment decisions have been made according to this classification. Given the impact that the DNA repair deficiencies of tumors can have on response to treatment, it seems reasonable to consider categorizing tumors according to their DNA repair defects and to use this information to personalize cancer treatments [1, 7]. The identification of DNA repair defects in tumor cells and the evaluation of their influence on the cytotoxicity of anticancer agents have become active areas of research. As a result, hundreds of reports assessing the influence of defects in DNA repair proteins on the cytotoxicity of a variety of anticancer drugs have been published in the last few years. The main purpose of this article is to compile the results of these reports. After providing a brief overview of the major DNA repair pathways, this article addresses whether specific defects in proteins involved in the major DNA repair pathways increase, reduce or do not change the cytotoxicity of the FDA-approved anticancer drugs. This information may provide a global view of how a defective DNA repair pathway modifies chemotherapy effectiveness, and may also help predict response to anticancer drugs in patients with tumors having specific DNA repair defects.



## II. Overview of DNA repair pathways

The DDR machinery maintains genomic instability by detecting DNA damage, signaling its presence and mediating its repair. The DDR is a complex network that includes a set of DNA repair pathways, damage tolerance processes, and cell-cycle checkpoint mechanisms. Because several excellent reviews have recently been published on the DDR, on DNA repair pathways and on the influence of these processes on cancer therapy [1, 2, 8-12], this part of the article only seeks to provide a brief overview of the major DNA repair pathways.

Several major DNA repair pathways are known to participate in the repair of most types of DNA damage: homologous recombination (HR) repair, non-homologous end joining (NHEJ) repair, base excision repair (BER), nucleotide excision repair (NER), mismatch repair (MMR), Fanconi anaemia (FA) repair, translesion synthesis (TLS) and direct reversal repair (DRR). The choice of each of these pathways largely depends on the type of DNA damage that occurs; but other factors, such as the phase of the cell cycle, are known to play a role. Most of these pathways incorporate a similar set of tightly coordinated processes that include the detection of DNA damage, the accumulation of DNA repair factors at the site of damage and, finally, the physical repair of the lesion [1, 8].

### *Homologous Recombination Repair*

HR is a biological mechanism involved in the repair of DNA inter-strand cross links, damage encountered during DNA replication and DNA double-strand breaks (DSBs) [13]. DSBs are lethal DNA damages caused by free radicals, some chemotherapeutic agents (e.g., etoposide) and ionizing radiation. After DNA damage, HR promotes accurate DNA repair by using an extended, undamaged homologous sequence as template. HR occurs during the late S and G<sub>2</sub> phases, when the damaged chromosome can enter into physical contact with its undamaged homologous chromosome which is used as template for repair [14]. HR is initiated by MRN complex (MRE11-RAD50-NBS1), which recognizes DSBs and resects them in the 5' → 3' direction [15]. The result is the formation of a 3' single-stranded DNA fragment (ssDNA) which is immediately covered by RAD52 to protect it against nuclease attacks [15]. RAD52 then interacts with RAD51 and, with the help of other proteins (e.g., BRCA2, RAD54, XRCC2 and XRCC3), RAD51 forms a nucleoprotein filament on ssDNA and catalyzes homologous DNA pairing and strand exchange. After DNA synthesis, ligation and branch migration, the resulting structure is resolved [16].

### *Non-Homologous End Joining Repair*

NHEJ is also involved in the repair of DSBs. In contrast to HR, NHEJ ligates the two ends of a DSB without the requirement of a homologous template. NHEJ is error-prone, as sometimes this process can cause the deletion or mutation of nucleotides around the DSB site. NHEJ occurs throughout the cell cycle, but mainly in the G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> phases. The first step in NHEJ is the binding of Ku70/Ku80 heterodimer to the DSB. The Ku heterodimer then binds to the DNA-dependent protein kinase catalytic subunit (DNA-PKcs) and activates the XRCC4-ligase IV complex. This complex binds to the ends of DNA molecules and links together duplex DNA molecules with complementary but non-ligatable ends. Artemis, XLF, Polmu and Pollambda are other relevant proteins involved in NHEJ [15, 17].

### *Base Excision Repair*

The BER pathway is involved in removing a single base (or a short strand containing a damaged base) that has been damaged by oxidative lesions, alkylation products or single strand breaks (SSBs). The first step in BER is the recognition of the DNA damage by a specific DNA glycosylase (e.g., MPG or OGG1) which removes the damaged base/s. The remaining abasic site is processed by apurinic or apyrimidinic endonuclease (APEX1), which creates a strand incision. A DNA polymerase (e.g., POL $\beta$ , POL $\delta$  or POL $\epsilon$ ) then fills the gap and the XRCC1/ligase III complex executes strand ligation [15, 17]. Other important components of the BER pathway are the poly(ADP-ribose) polymerases (PARPs), PCNA and FEN1.

### *Nucleotide Excision Repair*

Whereas BER repairs small base adducts, NER repairs some of the bulkier DNA adducts that distort the DNA helical structure, such as those induced by UV radiation and some mutagenic chemicals or chemotherapeutic drugs. NER can be divided into two sub-pathways: the global genome NER (GG-NER) and the transcription-coupled NER (TC-NER). GG-NER identifies and removes damages all over the genome whereas TC-NER repairs actively transcribed genes. In GG-NER, the DNA lesion is recognized by the XPC/HR23B, RPA/XPA or DDB1/DDB2 complexes. In TC-NER, CS proteins (CSA and CSB) recognize DNA damage. The subsequent steps in both GG-NER and TC-NER are similar. Several factors, including transcription factor IIH (TFIIH), XPF, XPG and excision repair cross-complementing 1 (ERCC1), participate in the removal of a short single-stranded DNA segment (24-30 base pairs) containing the DNA lesion. The resulting gap in the DNA is filled by a DNA polymerase (i.e., POL $\delta$  or POL $\epsilon$ ), which uses the undamaged strand as a template, and is then ligated by DNA ligase I [8, 9].

### *Mismatch repair*

MMR plays an important role in maintaining genomic stability by repairing small insertions, deletions and base-base mismatches caused by spontaneous and induced base deamination, oxidation, methylation and replication errors [15, 17]. After DNA damage, the recognition of the lesion is performed by MutS $\alpha$  complex (MSH2 and MSH6) or MutS $\beta$  complex (MSH2 and MSH3). The next step is the binding of MutL $\alpha$  complex (MLH1 and PMS2) to MutS $\alpha$  complex (or MutS $\beta$  complex). The DNA double strand is then cleaved and unwinded by a DNA helicase II, and the excision of the DNA strand containing the mispaired base is executed by exonuclease I. Finally, repair synthesis and ligation is carried out by DNA polymerase (POL $\delta$ ) and DNA ligase I [8, 9].

### *Fanconi Anaemia Repair*

FA is a disorder characterized by chromosomal instability, bone marrow failure, cancer susceptibility, and a profound sensitivity to agents that produce DNA interstrand cross-links (ICLs). The FA pathway is thought to mediate the repair of ICLs at replication forks, possibly by facilitating ATR- and ATM-dependent checkpoint signaling and activating HR repair. The DNA damage response kinase ATR is recruited to single-stranded DNA at stalled replication fork structures. ATR activates the FA core complex, which is constituted by FANCA, FANCB, FANCE, FANCG, FANCL and FANCM. This complex

monoubiquitinates FANCD2, which associates with proteins of other DNA repair pathways such as HR and TLS [18].

### *Translesion Synthesis*

TLS is a eukaryotic DNA damage tolerance pathway that allows the replication of past DNA lesions (e.g., thymine dimers or abasic sites), which may be induced by exposure to UV light or some chemical agents. One consequence of this process is the potential risk of introducing mutations [15]. During normal DNA replication, proliferating cell nuclear antigen (PCNA) stimulates replication by standard DNA polymerase. However, when replication is stalled as consequence of a DNA lesion, PCNA can be ubiquitinated by RAD6/RAD18 proteins and standard DNA polymerase can be replaced by a specialized polymerase (e.g., Polzeta, Polkappa and Poleta) that promotes lesion bypass and resumes DNA replication [15, 19].

### *Direct reversal repair. O<sup>6</sup>-methylguanine-DNA methyltransferase*

The simplest solution that emerged in evolution to repair some types of DNA damage is the direct reversal of lesions by specialized enzymes, such as the suicide enzyme O<sup>6</sup>-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT). Endogenous and external alkylating agents can transfer alkyl groups to guanine, thereby modifying the base and interfering with its pairing with cytosine during DNA replication. In human cells, that kind of lesions can be repaired in a single-step reaction by MGMT, which transfers the alkyl group from the alkylated guanine to an internal cysteine residue in its active centre. This reaction restore DNA to its intact state and leads to irreversible inactivation of MGMT [9, 15, 17].

## **III. Effect of DNA repair deficiencies on the cytotoxicity of drugs used in cancer therapy**

The following section compiles data from reports assessing the influence of defects in proteins involved in the major DNA repair pathways on the cytotoxicity of the FDA-approved anticancer drugs. Data were identified by searches of PubMed, combining the name of each FDA-approved anticancer drug with the name of each DNA repair pathway and the most relevant proteins of the pathway. Reference lists of selected identified articles and of relevant reviews were also inspected. Only articles published in English were included.

Data are organized in tables, each of which shows results for a particular group of anticancer drugs. For each drug, data have been organized in DNA repair pathways (i.e., HR, NHEJ, BER, NER, MMR, FA, TLS and DRR), and the DNA repair proteins of each pathway have been arranged in alphabetical order. After the protein name, several symbols have been used to show how a deficiency in such protein modifies the cytotoxicity of the drug. When the DNA repair protein was absent in the cell (e.g., by knocking out the gene) the symbols +, -, or = have been used to show whether the absence of the protein increased (+), decreased (-) or did not change (=) the cytotoxicity of the drug. When the levels or activity of the protein were decreased in the cell (e.g., by changes in expression or chemical inhibition) the symbols ↑, ↓,



or  $\leftrightarrow$  have been used to show whether the absence of the protein increased ( $\uparrow$ ), decreased ( $\downarrow$ ) or did not change ( $\leftrightarrow$ ) the cytotoxicity of the drug. Finally, after the protein name and the symbol, relevant references are provided.

Most DNA repair proteins reported in the tables are human or mammalian proteins. When no studies were available for a human or mammalian protein, data of proteins from other organisms (e.g., yeasts and bacteria) have been included. These latter DNA repair proteins are indicated in italics and correspond to the following human proteins: *APN1p*: APEX1; *DmBRCA2*: BRCA2; *EXO1p*: EXO1; *MAG1p*: MPG; *MGT1*: MGMT; *MLH1p*: MLH1; *MLH2p*: MLH2; *MRAD1*: RAD1; *MRE11p*: MRE11; *MSH3p*: MSH3; *MSH6p*: MSH6; *Mus-43*: XPA; *Mus-44*: ERCC1; *Mus-51*: Ku70; *Mus-52*: Ku80; *NTGp*: NTH; *OGG1p*: OGG1; *Pku70*: Ku70; *PMS1p*: PMS1; *PPMRE11*: MRE11; *PPRAD50*: RAD50; *Pso2p*: Artemis; *RAD1p*: XPF; *RAD10p*: ERCC1; *RAD13*: XPG; *RAD14p*: XPA; *RAD16*: XPF; *RAD18p*: RAD18; *RAD2p*: XPG; *RAD22A*: RAD52; *RAD27p*: XPG; *RAD3p*: XPD; *RAD4p*: XPC; *RAD51p*: RAD51; *RAD52p*: RAD52; *RAD6p*: RAD6; *REV1p*: REV1; *REV3p*: REV3; *RHP23*: HHR23A; *RHP54*: RAD54; *SWI10*: ERCC1; *UNG1p*: UNG; and *Yku70p*: Ku70.

Some authors have used synonyms to refer to some proteins generally known by other names. To avoid confusion, these synonyms (arranged in alphabetical order below) have not been included in the tables and conventional protein names have been used: AAG: MPG; APE1: APEX1; APNG: MPG; ERCC2: XPD; ERCC3: XPB; ERCC4: XPF; ERCC5: XPG; ERCC6: CSB; ERCC8: CSA; GTBP: MSH6; Ku86: Ku80; MED1: MBD4; NBN: Nbs1; NTHL1: NTH1; RAD30: *POLEta*; RECA: RAD51; RECQL2: WRN; SNM1 homolog C: Artemis; UDG: UNG; XRCC5: Ku80; XRCC6: Ku70; and XRCC7: DNA-PKcs.

Data were not available for the following FDA-approved anticancer drugs (in alphabetical order): abarelix (analogue of gonadotropin-releasing hormone), alemtuzumab (monoclonal antibody), aminoglutethimide (aromatase inhibitor), anastrozole (aromatase inhibitor), bendamustine (nitrogen mustard), bevacizumab (monoclonal antibody), bexarotene (retinoid), bicalutamide (antiandrogen), buserelin (analogue of gonadotropin-releasing hormone), cabazitaxel (antimitotic), clofarabine (purine analogue), cyproterone (antiandrogen), dasatinib (protein kinase inhibitor), estramustine (nitrogen mustard), everolimus (protein kinase inhibitor), exemestane (aromatase inhibitor), fluoxymesterone (androgen), flutamide (antiandrogen), formestane (aromatase inhibitor), goserelin (analogue of gonadotropin-releasing hormone), ibritumomab tiuxetan (monoclonal antibody), interleukin-2 (cytokine), ixabepilone (antimitotic), lapatinib (protein kinase inhibitor), lenalidomide (thalidomide analog), letrozole (aromatase inhibitor), leuprolide (analogue of gonadotropin-releasing hormone), leuprorelin (analogue of gonadotropin-releasing hormone), lometrexol (antifolate), megestrol (antiestrogen), mitotane (anti-adrenocorticoid), nilotinib (protein kinase inhibitor), nilutamide (antiandrogen), panitumumab (monoclonal antibody), plicamycin (cytotoxic antibiotic), raloxifene (antiestrogen), rituximab (monoclonal antibody), sorafenib (protein kinase inhibitor), temsirolimus (protein kinase inhibitor), toremifene (antiestrogen), tositumomab (monoclonal antibody), trastuzumab (monoclonal antibody), treosulfan (prodrug of a bifunctional sulfonate alkylating agent), triptorelin (analogue of gonadotropin-releasing hormone), vemurafenib (protein kinase inhibitor), vindesine (antimitotic).

Before showing the effect of DNA repair deficiencies on the cytotoxicity of a particular group of drugs, a brief description of their mechanisms of action is provided. References are not shown because numerous original articles have been required to elucidate



such mechanisms of action. This information has mainly been obtained from pharmacology textbooks and specialized web pages such as that of the NCI.

### III.1. Alkylating agents

Alkylating agents are among the oldest and most useful anticancer drugs. Their clinical use evolved from the observation of bone marrow suppression and lymph node shrinkage in soldiers exposed to mustard gas warfare during World War I. This large family of anticancer drugs works by inducing covalent bonds between highly reactive alkyl groups of the drugs (or of their active metabolites) and nucleophilic groups of nucleic acids and proteins (e.g., amine and sulfhydryl groups). The electrophilic properties of many of these drugs are mediated by the formation of carbonium ions (electron-deficient ions that react covalently with electron-rich groups, i.e., nucleophilic groups). The most common binding site for alkylating agents is the nitrogen atom of the amine group at position seven of the DNA base guanine. Many alkylating drugs have or generate two alkylating groups in its structure (bifunctional agents) and can induce crosslinking of DNA. These crosslinks may occur in the same strand (intrastrand crosslink) or in the opposite strands of the DNA (interstrand crosslink). Reactions between DNA and RNA, and between drug and proteins, may also occur. The most common mechanism by which these drugs initiate cancer cell death is covalent interaction with DNA, which alters DNA structure and function and causes inhibition of DNA replication, formation of DNA breaks and subsequent cell death. Although alkylating agents are not specific of any phase of the cell cycle, they are more active in rapidly dividing cells, probably because their DNA is more exposed than that of quiescent cells and because these cells also have less time to repair the DNA damage.

Alkylating agents are commonly classified in several groups: platinum compounds, nitrogen mustards, nitrosoureas, aziridines, and non-classical alkylating agents (agents whose chemical structure does not clearly reveal the alkylating function). Platinum compounds (cisplatin, carboplatin and oxaliplatin) are bifunctional drugs with a platinum atom responsible for their electrophilic properties. Nitrogen mustards (e.g., cyclophosphamide, iphosphamide and chlorambucil) have (or produce after metabolic activation) two chloroethyl groups responsible for their bifunctional alkylating activity. Nitrosoureas used in cancer therapy (e.g., carmustine and lomustine) have in their structure one or two chloroethyl groups, a nitroso group (R-NO) and a urea group (two amine groups joined by a carbonyl functional group). Nitrosoureas alkylate and crosslink DNA, and also carbamoylate DNA and proteins. Like the nitrogen mustards cyclophosphamide and iphosphamide, the aziridine thiotepa is an organophosphorus compound. However, instead of having two chloroethyl groups in its structure, it has three aziridine groups (three-membered heterocycles with one amine group and two methylene groups) that mediate the alkylating properties of thiotepa. Like most alkylating agents, thiotepa crosslinks DNA and induces inhibition of DNA replication. The alkyl sulphonate busulfan appears to act through formation of carbonium ions, resulting in DNA alkylation. Dacarbazine and temozolamide are triazene (N-N=N) derivatives that cause methylation of DNA at the O6 and N7 positions of guanine. Procarbazine is a methylhydrazine derivative that appears to inhibit the trans-methylation of methionine into transfer RNA, thereby preventing protein synthesis. It may also undergo auto-oxidation, resulting in the formation of cytotoxic free radicals which damage DNA through alkylation reactions. Other anticancer drugs (e.g., mitomycin C) have known alkylating properties but are not included in this section. This is because they also have other mechanisms of action or have traditionally been classified elsewhere (e.g., cytotoxic antibiotics).

Table 1 compiles data from reports assessing the influence of defects in proteins involved in the major DNA repair pathways on the cytotoxicity of the alkylating agents described above. Many results shown in this table are clearly in accordance with the mechanism of action of this group of drugs. Alkylating agents typically induce bulky DNA adducts that distort the DNA helical structure. Because this type of DNA damage is repaired by NER, cells with defects in most proteins involved in the NER pathway are hypersensitive to the cytotoxic activity of these drugs. Many alkylating agents are bifunctional molecules that induce inter-strand crosslinks. Since the FA pathway is involved in the repair of inter-strand crosslinks, it is not surprising that cells defective in proteins of this pathway are hypersensitive to alkylating drugs. These drugs can also produce DSBs when DNA adducts are encountered by the DNA replication machinery. Since the HR pathway plays an important role in the repair of DNA inter-strand crosslinks and DSBs, cells with deficiencies in proteins involved in HR are typically hypersensitive to alkylating agents. DNA lesions induced by alkylating agents may stall DNA replication. Defects in proteins of the DNA damage tolerance pathway TLS make cells more vulnerable to all tested alkylating agents; in this pathway, when replication is stalled as consequence of a DNA lesion, standard DNA polymerase is replaced by a specialized polymerase that promotes lesion bypass and resumes DNA replication.

No general conclusions can be drawn for the other DNA repair pathways. For instance, although the NHEJ pathway is involved in the repair of DSBs, defects in proteins of this pathway increase the cytotoxicity of some alkylating drugs (e.g., mechlorethamine) but not of others (e.g., cisplatin). The enzyme MGMT constitutes a DRR mechanism that can repair DNA damage induced by alkylating agents. This enzyme restores DNA integrity by transferring the alkyl group from an alkylated guanine to an internal cysteine residue in its active centre. Cells defective in MGMT are hypersensitive to some alkylating agents (e.g., nitrosoureas and dacarbazine) but not to others (e.g., cyclophosphamide and chlorambucil).

In patients, defects or decreased expression of proteins of some DNA repair pathways have been associated with a higher response to some alkylating agents. For instance, in patients with gliomas, inactivation of MGMT was associated with regression of the tumor and prolonged overall and disease-free survival of patients treated with the nitrosourea carmustine. Inactivation of MGMT was an independent and stronger prognostic factor than age, stage, tumor grade, or performance status [20]. MGMT deficiency also predicted the clinical response of primary gliomas to first-line chemotherapy with the alkylating agent temozolomide [21]. Absence or decreased levels of the NER protein ERCC1 has been associated with a high response to platinum-based chemotherapy of several types of cancer, including non-small-cell lung cancer, colorectal cancer, gastric cancer and ovarian cancer [22-26]. Defects in the HR protein BRCA1 have also been associated with a high response to platinum-based chemotherapy of lung and ovarian cancers [27, 28].

Unlike other DNA repair pathways, Table 1 shows that cells with defects in proteins involved in MMR are resistant to the cytotoxic activity of several alkylating agents, including cisplatin, carboplatin, fotemustine, busulfan, dacarbazine, and procarbazine. Because the MMR proteins are also involved in mediating the activation of cell cycle checkpoints and apoptosis in response to DNA damage, loss of MMR may result in drug resistance by impairing the ability of the cell to detect DNA damage and activate apoptosis [29]. In other words, a functional MMR system seems to be required for the detection of DNA damage induced by some drugs. MMR proficient cells can detect such DNA damage and respond by

inducing apoptosis. MRR deficient cells would not detect such DNA damage and would not activate apoptosis, therefore becoming resistant to these drugs. It is worth noting that cells deficient in NER are resistant to cisplatin and carboplatin, but not to their analogue oxaliplatin, probably because NER proteins recognize DNA adducts induced by cisplatin and carboplatin but not those induced by oxaliplatin [30].

### **III.2. Antimetabolites**

Antineoplastic antimetabolites comprise a large group of drugs that inhibit nucleic acid synthesis and induce the incorporation of fraudulent nucleotides into the DNA or RNA. This group of drugs is known as antimetabolites because they have chemical structures similar to those of cellular metabolites involved in the synthesis of nucleic acids. Because of this chemical similarity, enzymes involved in nucleic acid synthesis react with these drugs instead of with their natural substrates, resulting in enzyme inhibition and subsequent inhibition of nucleic acid synthesis. Reaction of these drugs with the enzymes may also result in the synthesis of fraudulent nucleotides that can be incorporated into the DNA or RNA, altering their structure and function. This group of drugs is specific for the S phase of the cell cycle.

Antimetabolites have been traditionally classified in three groups: antifolates (e.g., methotrexate and pemetrexed), pyrimidine analogs (e.g., fluorouracil, citarabine and gemcitabine) and purine analogs (e.g., mercaptopurine and thioguanine). Pyrimidine analogs are chemically related to the DNA bases cytosine, thymine and uracil (RNA), or to their nucleosides or nucleotides. Likewise, purine analogs share similar structures with the DNA bases adenine and guanine, or with their nucleosides or nucleotides. Folic acid, in the form of tetrahydrofolic acid, plays a critical role in nucleotide biosynthesis. The enzyme dihydrofolate reductase catalyzes the conversion of dihydrofolic acid into tetrahydrofolic acid and is the pharmacological target of the antifolate agent methotrexate. This drug binds to and inhibits the enzyme dihydrofolate reductase, resulting in inhibition of purine nucleotide and thymidylate synthesis and, subsequently, inhibition of DNA and RNA syntheses. Another representative example of how antimetabolites work is 5-fluorouracil (fluorouracil), which acts through a number of different mechanisms of action. In vivo, fluorouracil is converted to the active metabolite 5-fluoroxymidine monophosphate (F-UMP), which binds to and interferes with the activity of thymidylate synthase. This enzyme is required for synthesis of thymidine, one of the four essential building blocks of DNA. Another metabolite of 5-FU, the triphosphate nucleotide, is incorporated into RNA as a fraudulent base and interferes with its function. Interference with both thymidine formation and RNA function is important in producing the cytotoxic effects of 5-FU. Although 5-FU nucleotides can also be incorporated directly into DNA and affect its stability, the contribution to cell death remains unclear. Another example is cytarabine (cytosine arabinoside), which has the sugar arabinose instead of ribose. Cytarabine is converted to the triphosphate form within the cell and then competes with the physiological nucleotide for incorporation into the DNA. Because the arabinose sugar sterically hinders the rotation of the molecule within DNA, DNA replication stops. This agent also inhibits DNA polymerase, resulting in a decrease in DNA replication and repair. Gemcitabine is converted to the active metabolites difluorodeoxycytidine di- and triphosphate (dFdCDP, dFdCTP). dFdCDP inhibits ribonucleotide reductase, thereby decreasing the deoxynucleotide pool available for DNA synthesis; dFdCTP is incorporated into DNA, resulting in DNA strand termination and apoptosis. Thioguanine inhibits an enzyme involved



in purine synthesis and also incorporates into DNA and RNA, resulting in inhibition of DNA and RNA synthesis and cell death.

Table 2 compiles data from reports assessing the influence of defects in proteins involved in the major DNA repair pathways on the cytotoxicity of antimetabolites. It shows that defects in proteins involved in HR generally make cells hypersensitive to the cytotoxicity of all tested antimetabolites (e.g., raltitrexed, 5-fluorouracil, cytarabine, 5-azacytidine, gemcitabine and 6-thioguanine). The main cytotoxic mechanism of this group of drugs is inhibition of nucleotide synthesis. Depletion of nucleotides may initially result in stalled replication forks that, after prolonged treatment, collapse into DSBs that would be repaired by HR. Some antimetabolites (purine and pyrimidine analogues) may cause incorporation of fraudulent nucleotides with altered bases into the DNA. Because damaged bases are repaired by BER, it is expected that cells deficient in BER are hypersensitive to these drugs. Table 2 shows, however, that defects in proteins of the BER pathway do not always increase the cytotoxicity of antimetabolites. For instance, depending on which protein of the BER pathway is defective, the cytotoxicity of gemcitabine and thioguanine (two antimetabolites known to cause incorporation of nucleotides with modified bases into the DNA) can increase or decrease. Despite some exceptions, NER deficiencies do not seem to play an important role in the cytotoxicity of purine and pyrimidine analogues, and MMR deficiencies generally decrease the cytotoxicity of antimetabolites. As mentioned before, MMR proteins are also involved in mediating the activation of cell cycle checkpoints and apoptosis in response to DNA damage and, therefore, loss of MMR may result in drug resistance by impairing the ability of the cell to detect DNA damage and activate apoptosis [29]. Although no general conclusions can be drawn for the other DNA repair pathways, defects in specific proteins can increase or decrease the cytotoxicity of these drugs. This information may help predict response to these drugs in patients with tumors having defects in such DNA repair proteins.

### III.3. Cytotoxic antibiotics

Cytotoxic antibiotics are a group of DNA-damaging anticancer drugs comprising natural products isolated from bacteria of the *Streptomyces* genus (e.g., doxorubicin, daunorubicin, dactinomycin, bleomycin and mitomycin C) and chemically related compounds obtained by synthesis, semisynthesis or biotechnology (e.g., idarubicin, epirubicin, valrubicin and mitoxantrone). These drugs intercalate into the DNA, induce topoisomerase II-mediated DNA damage and/or generate reactive oxygen species (ROS).

Some of these drugs are known as anthracyclines (e.g., doxorubicin, daunorubicin, idarubicin and epirubicin). Anthracyclines share a common, four-membered anthracene ring complex with an attached sugar moiety (the ring complex is a chromophore and accounts for the intense colors of these compounds). The cytotoxic activity of these drugs seems to be mediated by three different mechanisms. Anthracyclines intercalate between base pairs in the DNA helix, thereby altering its structure and function. They also interfere with DNA topoisomerase II activity, leading to the formation of topoisomerase II-mediated DNA damage. They also form ROS that can damage DNA and cell membranes, resulting in cytotoxicity (and side effects such as cardiotoxicity). Mitoxantrone is an anthracenedione synthesized in an attempt to develop agents with comparable antitumor activity to doxorubicin, but with an improved safety profile. Like the anthracyclines, mitoxantrone is an intercalating topoisomerase II poison, but with less potential ROS formation. Dactinomycin

(actinomycin D) is a chromopeptide compound that intercalates between adjacent guanine-cytosine base pairs, blocking the transcription of DNA by RNA polymerase; it also causes single-strand DNA breaks, possibly via ROS formation. Bleomycin is a mixture of structurally related glycopeptide compounds isolated from *Streptomyces verticillus*. It forms complexes with iron that reduce molecular oxygen to superoxide and hydroxyl radicals which cause single- and double-stranded breaks in the DNA. Mitomycin C is a methylazirinopyrroloindoleione that generates ROS, alkylates DNA, and produces interstrand DNA cross-links, thereby inhibiting DNA synthesis. It also inhibits RNA and protein synthesis at high concentrations.

Table 3 compiles data from reports assessing the influence of defects in proteins involved in the major DNA repair pathways on the cytotoxicity of this group of anticancer agents. The most common mechanism of action of these drugs is production of DSBs, which may be mediated by topoisomerase II poisoning and/or formation of ROS. Because DSBs are repaired by HR and NHEJ, it is not surprising that defects in proteins involved in these pathways typically increase the cytotoxicity of all these drugs. Defects in specific proteins involved in other DNA repair pathways can increase or decrease the cytotoxicity of these drugs. Like other alkylating agents that produce interstrand DNA cross-links, mitomycin C is more cytotoxic in cells defective in NER and FA. Defects in these pathways do not typically modify the activity of other cytotoxic antibiotics that do not alkylate the DNA (e.g. doxorubicin and dactinomycin). A defective MMR pathway seems to decrease the cytotoxicity of some cytotoxic antibiotics (e.g. doxorubicin, epirubicin and bleomycin), probably because loss of MMR may result in drug resistance by impairing the ability of the cell to detect DNA damage and activate apoptosis [29]. Defects in proteins involved in BER increase the cytotoxicity of bleomycin; this drug induces oxidative damage and formation of SSBs, which are repaired by BER.

### III.4. Topoisomerase inhibitors

Topoisomerase inhibitors (also called topoisomerase poisons) comprise a group of anticancer drugs that cause DNA damage mediated by the enzymes DNA topoisomerase I or DNA topoisomerase II. These enzymes solve the topological problems associated with DNA replication, transcription, recombination and chromatin remodelling by introducing transient single- or double-strand breaks in the DNA. Topoisomerase poisons stabilize the normally transient topoisomerase–DNA complexes formed during the catalytic cycle of the enzyme; then, cellular processing converts these complexes into permanent DNA strand breaks that trigger cell death.

Topoisomerase inhibitors are classified into topoisomerase I inhibitors (topotecan and irinotecan) and topoisomerase II inhibitors (etoposide, teniposide and anthracyclines). Irinotecan (a prodrug converted to the biologically active metabolite 7-ethyl-10-hydroxycamptothecin: SN-38) and topotecan are semisynthetic derivatives of camptothecin (an alkaloid extracted from the bark of the Asian tree *Camptotheca acuminata* which was too toxic to be used in patients). Topoisomerase I poisons selectively inhibit topoisomerase I activity by stabilizing cleavable complexes between topoisomerase I and DNA. These drugs produce potentially lethal double-strand DNA breaks when complexes are encountered by the DNA replication machinery. Etoposide and teniposide are semisynthetic derivatives of podophyllotoxin, a botanical product extracted from the rhizome of the plant *Podophyllum*

*peltatum*. They stabilise the normally transient topoisomerase II–DNA complexes formed during the catalytic cycle of the enzyme, resulting in inhibition of DNA strand religation and formation of cytotoxic single- and double-stranded breaks in the DNA.

The influence of defects in proteins involved in the major DNA repair pathways on the cytotoxicity of topoisomerase inhibitors is shown in Table 4. Although camptothecin is not approved for cancer therapy, it has been included in this review because its mechanism of action is similar to that of its derivatives topotecan and irinotecan, which have been less studied. Table 4 shows that cells with defects in most proteins involved in HR and NHEJ are hypersensitive to the cytotoxic activity of topoisomerase I and II inhibitors. Poisoning of topoisomerases I and II eventually produce DSBs when complexes are encountered by the DNA replication machinery. Since DSBs are repaired by HR and NHEJ, deficiencies in these pathways typically increase the cytotoxicity of topoisomerase poisons. Knowing that SSBs are repaired by BER, the ability of topoisomerase I poisons to produce SSBs may explain why cells deficient in proteins involved in BER are more sensitive than parental cells to these drugs. Defects in proteins involved in other DNA repair pathways can also modify the cytotoxicity of these drugs. For instance, deficiency in some proteins involved in the MMR pathway (e.g. MLH1 and MLH2) may decrease the cytotoxicity of etoposide, topotecan and irinotecan, probably because loss of MMR may result in drug resistance by limiting the ability of the cell to detect DNA damage and activate apoptosis [29, 31].

### III.5. Antimitotic agents

Microtubule-targeting drugs (commonly known as antimitotic agents) are a group of naturally occurring compounds (e.g., vincristine, vinblastine and paclitaxel) and chemically related derivatives (e.g., vinorelbine and docetaxel) that bind to the protein tubulin and alter the normal balance between polymerization and depolymerization of microtubules. This alteration in microtubule dynamics causes disruption of mitotic spindle assembly and arrest of cell division in the M phase of the cell cycle (mitosis).

These drugs have traditionally been classified into vinca alkaloids and taxanes. The term vinca alkaloid is used for bisindol alkaloids isolated from the plant *Catharanthus roseus* (formerly known as *Vinca rosea*) and for their semisynthetic or synthetic derivatives. Taxanes are a group of diterpene compounds with a taxane nucleus in their structure, some of which have anticancer activity (e.g., paclitaxel and docetaxel). Paclitaxel (taxol) was isolated from the bark of the Pacific yew tree, *Taxus brevifolia*; however, like docetaxel, it is now produced semisynthetically from compounds obtained from the needles of the European yew, *Taxus baccata*. Unlike the vinca alkaloids, which inhibit tubulin assembly, taxanes promote microtubule assembly and interfere with microtubule disassembly, resulting in formation of inappropriately stable, nonfunctional microtubules.

Table 5 compiles data from reports assessing the influence of defects in proteins involved in the major DNA repair pathways on the cytotoxicity of microtubule-targeting drugs. Although the DNA is not the pharmacological target of these drugs, data show that defects in specific DNA repair proteins may increase or decrease the cytotoxicity of these drugs. For example, cells deficient in NHEJ are hypersensitive to the cytotoxicity of the vinca alkaloid vincristine, glioma tumor xenografts defective in MMR are hypersensitive to vinorelbine [32], and a decreased expression of BRCA2 mRNA (HR) was associated with a favorable response to docetaxel in breast cancer patients [33]. It is unclear why defects in

some DNA repair proteins increase the cytotoxicity of microtubule-targeting drugs. The ability of some of these drugs to induce DNA damage [34, 35], and the possible involvement of some DNA repair proteins in pathways that prevent cell death in response to these drugs, may play a role. On the other hand, cells lacking BRCA1 were highly resistant to the cytotoxicity of paclitaxel and vinorelbine; a functional BRCA1 may be required for an effective apoptotic response to these drugs [36].

### **III.6. Hormonal and targeted therapies**

Hormonal therapy inhibits the growth of hormone-sensitive tumors (e.g., some breast, prostate and endometrial cancers) by reducing hormone production or by interfering with hormone action. Tamoxifen, a nonsteroidal selective estrogen receptor modulator (SERM), competitively inhibits the binding of the hormone estradiol to estrogen receptors in some tissues, thereby preventing estrogen action. The result is an inhibition of tumor growth in estrogen-sensitive tumors. Fulvestrant also causes antiestrogenic effects but, unlike tamoxifen (which has partial agonist effects in some tissues), fulvestrant is a pure antagonist of the estrogen receptor.

Some glucocorticoids (a class of steroid hormones) are also useful anticancer agents because of their anti-inflammatory, immunomodulating and lymphotoxic effects. Their primary use is in the treatment of some hematologic malignancies (e.g., lymphomas, lymphocytic leukemias, and multiple myeloma). Prednisolone, prednisone and dexametasone enter the nucleus where they bind to and activate specific nuclear receptors, resulting in an altered gene expression and inhibition of proinflammatory cytokine production. They can also decrease the number of circulating lymphocytes, induce cell differentiation, and stimulate cell death in sensitive tumor cells populations.

Cancer-targeted therapies are therapies intended to target the molecular defects of cancer cells specifically. FDA-approved cancer-targeted therapies include drugs that interfere with cell growth signaling or tumor blood vessel formation, promote the specific death of cancer cells, stimulate the immune system to kill specific cancer cells, and deliver cytotoxic drugs to cancer cells. Many targeted therapies are included in the groups of protein kinase inhibitors (e.g., imatinib, erlotinib, sunitinib and gefitinib) or monoclonal antibodies (e.g., cetuximab). Erlotinib and cetuximab are examples of protein kinase inhibitors and monoclonal antibodies that induce anticancer effects by targeting the epidermal growth factor receptor (EGFR). Erlotinib binds to the intracellular catalytic domain of EGFR tyrosine kinase, thereby inhibiting EGFR phosphorylation and blocking the signal transduction events and tumorigenic effects associated with EGFR activation. The monoclonal antibody cetuximab binds to the extracellular domain of the EGFR, thereby preventing the activation and subsequent dimerization of the receptor; the decrease in receptor activation and dimerization inhibits signal transduction and proliferative effects associated with EGFR activation.

Table 6 compiles data from reports assessing the influence of defects in proteins involved in the major DNA repair pathways on the cytotoxicity of hormonal and targeted therapies. Although the DNA is not the pharmacological target of these drugs, data show that defects in specific DNA repair proteins may increase or decrease the cytotoxicity of these drugs. For instance, chemical inhibition of the BER protein PARP increased the cytotoxicity of the anti-EGFR monoclonal antibody cetuximab, and depletion of nuclear BRCA1 (HR)



increased the cytotoxicity of the inhibitor of the EGFR tyrosine kinase erlotinib; recent evidence suggests that both drugs can induce DNA damage [37, 38]. Defects in proteins of the NHEJ, BER and TLS pathways increased the cytotoxicity of the antiestrogenic drug tamoxifen, which can also induce DNA damage [39-42]. Deficiencies in the HR protein BRCA1, however, decreased the cytotoxicity of the antiestrogens tamoxifen and fulvestrant; this effect may be associated with a low estrogen receptor expression in BRCA1-mutant tumors [43].

### III.7. Other anticancer drugs

This section includes drugs with mechanisms of action different from those of other groups of drugs discussed before. Bortezomib is a dipeptide boronic acid analogue that induces anticancer effects by inhibiting the proteasome (proteasomes are protein complexes within cells that are responsible for degrading and eliminating cellular proteins, some of which regulate critical functions for successful cancer growth). Inhibition of proteasome by bortezomib results in disruption of several cell signaling pathways, leading to cell cycle arrest, apoptosis, and inhibition of angiogenesis. Some leukemic cells cannot synthesize the amino acid L-asparagine de novo due to the absent or deficient expression of the enzyme asparagine synthase. L-asparaginase is an enzyme with antileukemic activity that degrades the amino acid L-asparagine, resulting in the depletion of L-asparagine, inhibition of protein synthesis, cell cycle arrest in the G1 phase, and apoptosis in susceptible leukemic cells. Hydroxyurea inhibits the enzyme ribonucleoside diphosphate reductase, which is required to convert ribonucleotides into the deoxyribonucleotide forms required for both DNA synthesis and repair. Cells accumulate in the S phase because DNA synthesis is inhibited, and only abnormally short DNA strands are produced. Arsenic trioxide is an effective treatment for acute promyelocytic leukemia, probably because of its ability to induce apoptosis, promote cell differentiation and suppress cell proliferation. Trabectedin is a tetrahydroisoquinoline alkaloid isolated from the marine organism *Ecteinascidia turbinata*. It binds to the minor groove of DNA, interferes with the DNA repair machinery and induces lethal DNA strand breaks. Thalidomide (a drug that caused severe limb deformities when used by pregnant women as an over-the-counter sedative in the 1960s) has a complex cytotoxic mechanism of action. It is a glutamic acid derivative that inhibits angiogenesis, induces free-radical oxidative damage to DNA, interferes with adhesion of cancer cells, inhibits tumor necrosis factor- $\alpha$  production, and alters secretion of cytokines that affect the growth of cancer cells. Vorinostat is a synthetic hydroxamic acid derivative that inhibits histone deacetylases, which causes accumulation of both hyperacetylated histones and transcription factors and leads to anti-proliferative effects and apoptosis. Tretinoin is a naturally-occurring acid of retinol that binds to and activates retinoic acid receptors, thereby inducing changes in gene expression that lead to cell differentiation and decreased cell proliferation.

Table 7 compiles data from reports assessing the influence of defects in proteins involved in the major DNA repair pathways on the cytotoxicity of these drugs. Trabectedin is the only drug from this group whose primary pharmacological target is the DNA. Since trabectedin interferes with the transcription-coupled NER machinery to induce lethal DNA strand breaks and cell death, cells with defects in proteins of this pathway (e.g., CSA, CSB, ERCC1, XPA, XPB, XPD, XPF and XPG), but not of the global genomic NER pathway (e.g., XPC), are resistant to the cytotoxicity of trabectedin. Because DSBs are repaired by HR and NHEJ, a deficient HR pathway and deficiencies in some proteins of the NHEJ pathway increase the cytotoxicity of trabectedin. This drug produces DNA modifications similar to



interstrand crosslinks [44], which may explain why cells defective in FA (involved in interstrand crosslinks repair) are hypersensitive to trabectedin. The influence of defects in DNA repair proteins on the cytotoxicity of hydroxyurea has been evaluated in numerous studies. Hydroxyurea inhibits the enzyme required to convert ribonucleotides into deoxyribonucleotides, which are necessary for both DNA synthesis and repair. Evidence suggests that depletion of nucleotides by this drug may initially result in stalled replication forks that, after prolonged treatment, collapse into DSBs [45]. Since DSBs are repaired by HR and NHEJ, deficiencies in these pathways should increase the cytotoxicity of hydroxyurea. However, although deficiencies of some proteins of these pathways increase the cytotoxicity of hydroxyurea, deficiencies of other proteins do not change its activity or even reduce it (see Table 7). Deficiencies in the BER, MMR and DRR pathways seem to increase the cytotoxicity of hydroxyurea, and defects in NER, FA and TLS do not seem to have a marked effect in its cytotoxicity. With regard to the other drugs compiled in Table 7, deficiencies in BER increase the cytotoxicity of bortezomib and tretinoin and decrease that of L-asparaginase, deficiencies in NER increase the cytotoxicity of arsenic trioxide but decrease that of thalidomide, and deficiencies in MMR do not modify the cytotoxicity of L-asparaginase and vorinostat.

## IV. Conclusions

Tumor cells commonly have DNA repair deficiencies that can profoundly alter the efficacy of chemotherapy. The identification of DNA repair defects in tumor cells and the evaluation of their influence on the cytotoxicity of anticancer agents have become active areas of research. Much information has become available in recent years on the influence of defects in proteins involved in the major DNA repair pathways on the cytotoxicity numerous anticancer drugs. This information has been reviewed for the first time in this article and several conclusions can be made.

The first conclusion is that deficiencies in proteins involved in DNA repair pathways alter the cytotoxicity of numerous FDA-approved anticancer drugs. Data were available for 66 drugs used in cancer therapy, and the cytotoxicity of 60 of them was altered in cells deficient in specific DNA repair proteins. The cytotoxicity of the remaining 6 drugs (i.e., iphosphamide, valrubicin, daunorubicin, teniposide, dexamethasone and vorinostat) was not altered in cells deficient in particular DNA repair proteins. In the case of the DNA-damaging drugs iphosphamide, valrubicin, daunorubicin, teniposide, this is probably because the influence of relevant DNA repair proteins has not yet been evaluated. It is also worth noting that deficiencies in proteins involved in DNA repair pathways can not only alter the cytotoxicity of drugs that target the DNA, but also that of drugs whose primary pharmacological target is not the DNA. This may be explained by the ability of these latter to induce DNA damage (which may play a role in their cytotoxicity), or by the involvement of some DNA repair proteins in survival or apoptotic pathways triggered by these drugs.

Deficiencies in particular DNA repair proteins and pathways can alter the cytotoxicity of related drugs differently. It is not completely accurate, therefore, to generalize and say that deficiencies in a specific DNA repair pathway modify the cytotoxicity of a particular group of anticancer drugs. Although some general conclusion can be made in this regard (discussed in section III), results can substantially change when a specific protein of the pathway or a particular drug of the group is studied. For instance, it is common to find in the literature that

deficiencies in the NER pathway or in the protein MGMT (DRR) increase the cytotoxicity of alkylating agents. Although this is true for many alkylating drugs, data show that cells defective in the NER protein CSB are resistant to the alkylating drug mechlorethamine, or that deficiencies in the protein MGMT do not change the cytotoxicity of the alkylating agents cyclophosphamide or melphalan (see Table 1 for references). Knowing that tumors commonly have deficiencies in particular proteins and that patients are treated with specific drugs, it seems sensible to avoid generalizations and always specify both the protein and the drug.

The information compiled in this article may help understand the cytotoxic mechanism of some drugs. For instance, although the main cytotoxic mechanism of antimetabolites is inhibition of nucleotide synthesis, it is not clear how this inhibition triggers cell death. Table 2 shows that defects in proteins involved in HR typically make cells hypersensitive to the cytotoxicity of all tested antimetabolites, thereby suggesting that the formation of DSBs (repaired by HR) plays an important role in the anticancer activity of these drugs. Depletion of nucleotides induced by antimetabolites may initially result in stalled replication forks, which may eventually collapse into DSBs that trigger cell death.

Because the DNA repair deficiencies of tumors can have a significant impact on patient response to treatment, researchers are beginning to consider classifying tumors according to their DNA repair defects and to use this information for cancer treatment decisions. The use of DNA repair gene profiles and the identification of molecular and functional DNA repair biomarkers will provide useful data for this purpose [1, 7]. Information on the influence of particular DNA repair defects on the cytotoxicity of the existing anticancer drugs will also be essential for cancer treatment decisions. This article has compiled this information and shows whether specific defects in proteins involved in the major DNA repair pathways increase, reduce or do not change the cytotoxicity of the FDA-approved anticancer drugs. This information may help predict response to anticancer drugs in patients with tumors with specific DNA repair defects, which would improve the efficacy of their treatments.

Table 1. Effect of DNA repair deficiencies on the cytotoxicity of alkylating agents.

ALKYLATING AGENTS	
Platinum compounds	
Cisplatin	<p>HR: BLM + [46]; BRCA1 + [36, 47-50]; BRCA2 + [47, 48]; Nbs1 ↑ [51]; RAD50 ↑ [52]; RAD51B + [53]; RAD51C + [54, 55]; RAD51D + [55]; RAD52 = [47]; RAD54 + [47, 56]; XRCC2 + [47, 57]; XRCC3 + [47, 56, 58].</p> <p>NHEJ: Artemis + [59]; Artemis = [60]; DNA-PKcs = [58, 61]; Ku70 = [62]; Ku80 = [56]; LigIV = [47]; XRCC4 + [59]; WRN + [46].</p> <p>BER: APEX1 ↑ [63-65]; APEX1 ↔ [66]; XRCC1 = [58]; FEN1 = [47]; PARP-1 + [47]; POL<math>\beta</math> = [47, 67-69]; POL<math>\beta</math> = [70]; MBD4 = [71, 72]; NTH1 ↑ [73]; UNG = [70].</p> <p>NER: CSA + [74]; CSB + [74]; ERCC1 + [58, 75]; hHR23A ↑ [76]; XPA + [47, 74, 77, 78]; XPB + [75]; XPC = [74]; XPD + [58, 74]; XPF + [74, 77]; XPG + [47, 74].</p> <p>MMR: MLH1 = [79-81]; MLH2p = [82]; MSH2 = [79, 83, 84]; MSH3 + [47, 85]; MSH6p = [86]; MSH6p = [82]; PMS1p = [82]; PMS2 = [84, 87].</p> <p>FA: FANCA + [88-90]; FANCC + [47, 88, 90, 91]; FANCD2 + [88, 90]; FANCF + [92]; FANCG + [47, 90, 91]; FANCL + [90].</p> <p>DRR: MGMT = [93, 94]; MGMT ↑ [95].</p> <p>TLS: POL<math>\eta</math> + [96-98]; POL<math>\kappa</math> + [47]; RAD6B ↑ [99]; RAD18 + [47]; RAD30 + [47]; REV1 ↑ [100]; REV3 + [47, 86].</p>
Carboplatin	<p>HR: BRCA1 + [48, 49]; BRCA2 + [48, 101]; RAD52p = [82]; RAD51 ↔ [102].</p> <p>BER: PARP-1 ↑ [103]; PARP-2 ↑ [103].</p> <p>NER: ERCC1 ↑ [28, 104]; ERCC1 ↓ [102]; RAD1p + [82]; XPA + [78]; XPD ↔ [105].</p> <p>MMR: MLH1 = [79, 80]; MLH2p = [82]; MSH2 = [79, 84]; MSH3p = [82]; MSH6p = [82]; PMS1p = [82]; PMS2 = [84].</p> <p>FA: FANCC + [106]; FANCG + [106].</p> <p>DRR: MGMT ↑ [95].</p> <p>TLS: POL<math>\eta</math> + [98].</p>
Oxaliplatin	<p>HR: BRCA1 + [49].</p> <p>BER: POL<math>\beta</math> + [69]; MBD4 = [71].</p> <p>NER: CSB ↑ [107]; ERCC1 ↑ [104].</p> <p>MMR: MLH1 = [29]; MSH2 = [29]; MSH3 + [85].</p> <p>FA: FANCA + [88]; FANCC + [88, 106]; FANCD2 + [88]; FANCG + [106];</p> <p>TLS: POL<math>\eta</math> + [97, 98]; RAD6p + [108]; RAD18p + [108].</p>
Nitrogen mustards	
Cyclophosphamide	<p>BER: PARP-1 ↑ [103, 109]; PARP-2 ↑ [103, 109]; XRCC1 = [110].</p> <p>NER: CSB = [111]; ERCC1 + [110]; ERCC1 + [111]; XPA = [112]; XPB = [111]; XPD = [110]; XPD = [111]; XPF + [111]; XPF + [112]; XPG = [111].</p>

	<p>MMR: MLH1 =[79, 80]; MSH2 =[79].</p> <p>FA: FA +[113, 114].</p> <p>DRR: MGMT =[93, 115].</p> <p>TLS: REV1 ↑[19].</p>
Iphosphamide	DRR: MGMT =[93].
Chlorambucil	<p>HR: BRCA2 +[116]; RAD51 ↑[117, 118]; RAD51D +[119]; XRCC3 ↑[117].</p> <p>NHEJ: DNA-PKcs =[119]; DNA-PKcs ↑[120, 121]; Ku80 ↔[122].</p> <p>BER: MPG =[123]; XRCC1 =[110].</p> <p>NER: ERCC1 +[110, 119]; XPD +[110]; XPD =[119]; XPF +[119].</p> <p>FA: FANCC +[91]; FANCG +[91, 124].</p> <p>DRR: MGMT =[93, 94].</p>
Mechlorethamine	<p>HR: <i>MRE11p</i> +[125, 126]; <i>RAD51p</i> +[125]; <i>RAD52p</i> +[125]; <i>RAD54p</i> +[125]; <i>RAD59p</i> +[125]; XRCC2 +[127]; XRCC3 +[127].</p> <p>NHEJ: DNA-PKcs +[128]; Ku80 +[127, 128]; <i>Pso2p</i> +[126]; <i>Yku70p</i> =[125].</p> <p>BER: <i>APN1p</i> +[129]; MPG =[123, 130]; <i>RAD27p</i> +[126]; <i>OGG1p</i> +[129]; PARP ↑[131].</p> <p>NER: ERCC1 +[127]; CSB -[127]; <i>RAD4p</i> +[126, 129]; <i>RAD14p</i> +[125, 129]; XPB +[127]; XPD +[127]; XPF +[127]; XPG +[127].</p> <p>MMR: <i>EXO1p</i> =[126]; <i>MLH1p</i> =[125, 126]; <i>MSH2p</i> =[126]; <i>MSH3p</i> =[126]; <i>MSH6p</i> =[126].</p> <p>FA: FANCC +[132].</p> <p>DRR: MGMT +[130].</p> <p>TLS: <i>RAD6p</i> +[125]; <i>RAD18p</i> +[125]; <i>REV3p</i> =[125].</p>
Melphalan	<p>HR: BRCA2 +[116, 133]; XRCC2 +[47, 134]; XRCC3 +[134].</p> <p>NHEJ: DNA-PKcs +[128]; Ku70 =[47]; Ku80 +[128, 134]; SNM1a +[47].</p> <p>BER: APEX1 ↔[135]; MPG =[123]; PARP +[136]; POL<math>\beta</math> =[67, 68]; XRCC1 =[110].</p> <p>NER: CSB +[134]; CSB =[137]; ERCC1 +[110, 134, 137, 138]; XPA =[47]; XPB +[134, 137]; XPD +[134, 137]; XPD =[110]; XPF +[134, 137, 138]; XPG +[134].</p> <p>MMR: MLH1 =[79-81]; MSH2 =[79]; PMS2 =[139].</p> <p>FA: FANCC +[47, 91, 106, 133]; FANCD2 +[133]; FANCF ↑[140]; FANCG +[91, 106].</p> <p>DRR: MGMT =[93, 94].</p> <p>TLS: RAD18 +[47]; REV3 +[47, 133].</p>
<b>Nitrosoureas</b>	
Lomustine	<p>MMR: MLH1 +[141]; MLH1 =[81, 141]; MSH2 +[141]; MSH6 +[141]; MSH6 =[141]; MutL<math>\alpha</math> complex +[142]; MutS<math>\alpha</math> complex +[142]; PMS2 +[139, 142]; PMS2 =[141].</p> <p>DRR: MGMT +[93, 141].</p>

Carmustine	<p>HR: <i>RAD52p</i> +[143]; <i>RAD52p</i> =[86].</p> <p>BER: <i>APEX1</i> ↑[135]; <i>MPG</i> +[123, 144]; <i>MPG</i> =[145]; <i>PARP</i> +[136]; <i>POLβ</i> =[68].</p> <p>NER: <i>ERCC1</i> +[146]; <i>XPB</i> =[146]; <i>XPB</i> =[146]; <i>XPB</i> +[146].</p> <p>MMR: <i>MLH1</i> =[147]; <i>MSH3</i> =[148].</p> <p>FA: <i>FANCC</i> +[106]; <i>FANCG</i> +[106].</p> <p>DRR: <i>MGMT</i> +[93, 94, 149, 150].</p> <p>TLS: <i>RAD18p</i> +[143]; <i>REV3p</i> +[86].</p>
Fotemustine	<p>HR: <i>XRCC2</i> +[57].</p> <p>MMR: <i>MLH1</i> ↓[151]; <i>MSH1</i> ↓[152]; <i>MSH2</i> ↓[151, 152].</p> <p>DRR: <i>MGMT</i> +[94, 153].</p> <p>TLS: <i>REV3L</i> +[154].</p>
Nimustine	<p>HR: <i>BRCA2</i> +[116]; <i>RAD51</i> ↑[155]; <i>RAD54</i> +[156]; <i>XRCC2</i> +[156].</p> <p>NHEJ: <i>LigIV</i> +[156].</p> <p>BER: <i>APEX1</i> ↑[157]; <i>FEN1</i> ↔[158].</p> <p>FA: <i>FANCA</i> +[159]; <i>FANCC</i> +[159]; <i>FANCD1</i> +[159]; <i>FANCD2</i> +[159]; <i>FANCG</i> +[159].</p> <p>DRR: <i>MGMT</i> +[93, 115, 160].</p>
Streptozocin	<p>BER: <i>APEX1</i> ↑[135]; <i>MPG</i> -[161]; <i>PARP</i> -[162].</p> <p>MMR: <i>MSH2</i> -[163].</p> <p>DRR: <i>MGMT</i> +[93, 94, 150].</p>
Elmustine	DRR: <i>MGMT</i> +[93].
<b>Aziridines</b>	
Thiotepa	<p>BER: <i>APEX1</i> ↑[135]; <i>OGG1</i> ↑[164].</p> <p>FA: <i>FA</i> +[165].</p> <p>DRR: <i>MGMT</i> =[94].</p>
<b>Non-classical alkylating agents</b>	
Busulfan	<p>BER: <i>APEX1</i> ↑[135]; <i>XRCC1</i> =[110].</p> <p>NER: <i>ERCC1</i> +[110]; <i>XPB</i> +[110].</p> <p>MMR: <i>MSH2</i> -[163].</p> <p>DRR: <i>MGMT</i> =[94, 166].</p>
Dacarbazine	<p>HR: <i>RAD51</i> ↑[167].</p> <p>BER: <i>APEX1</i> ↑[168]; <i>PARP</i> ↔[169].</p> <p>MMR: <i>MLH1</i> -[170].</p> <p>DRR: <i>MGMT</i> +[115, 170].</p>
Procarbazine	MMR: <i>MSH2</i> -[163].

	DRR: MGMT +[171].
Temozolomide	<p>HR: BRCA2 +[172, 173]; MRE11 ↓[174]; RAD51 ↑[155, 175]; RAD54 =[176]; XRCC2 +[57, 172, 176].</p> <p>NHEJ: DNA-PKcs +[172]; Ku80 =[172]; LigIV +[176].</p> <p>BER: APEX1 ↑[135]; FEN1 ↑[158]; MBD4 =[72]; MPG =[145, 177]; PARP-1 ↑[103, 109]; PARP-2 ↑[103, 109]; POL<math>\beta</math> +[68, 177]; POL<math>\lambda</math> =[177].</p> <p>MMR: MLH1 =[147]; MSH2 =[83]; MSH6 =[147]; PMS2 =[139].</p> <p>FA: FANCA =[159]; FANCC =[159]; FANCD1 +[159]; FANCD2 +[159]; FANCG +[159].</p> <p>DRR: MGMT +[94, 150, 172].</p> <p>TLS: POL<math>\iota</math> =[177]; REV3L +[154].</p>

Table 2. Effect of DNA repair deficiencies on the cytotoxicity of antimetabolites.

ANTIMETABOLITES	
<b>Antifolates</b>	
Methotrexate	<p>NHEJ: Ku80 +[178].</p> <p>NER: XPA +[179].</p> <p>MMR: MLH1 -[180]; MSH2 +[181]; PMS2 -[180].</p> <p>DRR: MGMT +[182].</p>
Raltitrexed	<p>HR: RAD51 ↑[183].</p> <p>BER: PARP ↓[184]; POL<math>\beta</math> -[184, 185]; UNG ↔[186, 187]; XRCC1 -[185].</p> <p>MMR: MLH1 +[188]; MSH2 +[188].</p>
Pemetrexed	<p>BER: UNG +[189].</p> <p>NER: ERCC1 ↑[190].</p>
<b>Pirimidine analogs</b>	
5-Fluorouracil/ Capecitabine	<p>HR: BLM +[46]; BRCA1 =[36, 49]; BRCA2 +[191]; <i>RAD51p</i> -[191]; <i>RAD52p</i> +[192]; RAD54 +[191]; XRCC3 -[193].</p> <p>NHEJ: Ku 70 =[191]; WRN +[46].</p> <p>BER: APEX1 ↑[135]; <i>APN2p</i> +[192]; MBD4 - [71, 72]; <i>NTG1p</i> +[192]; <i>NTG2p</i> +[192]; PARP-1 ↔[194, 195]; PARP-2 ↔[194, 195]; UNG =[196]; <i>RAD27p</i> =[192]; <i>RAD27p</i> -[191]; XRCC1 ↔[194].</p> <p>NER: <i>RAD1p</i> =[192]; <i>RAD2p</i> =[191]; <i>RAD10p</i> =[192].</p> <p>MMR: MLH1 -[197-199]; MSH2 =[79]; MSH2 -[197]; <i>PMS1p</i> +[192].</p> <p>FA: FANCC =[91]; FANCD2 =[191]; FANCG =[91].</p> <p>DRR: MGMT ↑[200]; MGMT ↔[201].</p> <p>TLS: <i>RAD18p</i> =[192]; <i>REV1p</i> =[192]; <i>REV3p</i> =[192].</p>
Floxuridine	<p>NHEJ: Artemis +[59]; XRCC4 +[59].</p> <p>BER: APEX1 ↑[135, 194]; PARP-1 ↑[194, 195]; PARP-2 ↑[194, 195]; UNG =[196]; XRCC1 ↑[194].</p> <p>MMR: MLH1 -[198].</p>
Cytarabine	<p>HR: XRCC3 +[202].</p> <p>NHEJ: WRN +[203].</p> <p>BER: APEX1 ↔[66]; PARP ↔[204]; POL<math>\lambda</math> =[205].</p> <p>NER: ERCC1 =[202]; XPD =[202]; XPF =[206].</p> <p>MMR: MSH2 +[207].</p> <p>TLS: POL<math>\eta</math> +[96].</p>
5-azacytidine	<p>HR: RAD51D +[208]; XRCC3 + [208].</p> <p>NHEJ: DNA-PKcs =[208].</p>

	<p>BER: PARP ↔ [209].</p> <p>NER: XPA =[208]; XPD =[208]; XPF + [208].</p> <p>MMR: MLH1 =[210].</p> <p>FA: FANCD1 + [208]; FANCD2 + [208]; FANCF ↑ [211].</p> <p>DRR: MGMT ↑ [212].</p>
Gemcitabine	<p>HR: BRCA1 +[49]; MRE11 ↑[213]; RAD50 ↑[213]; RAD51 ↑[214]; XRCC2 =[215]; XRCC3 =[58]; XRCC3 =[215].</p> <p>NHEJ: DNA-PKcs =[58, 216]; Ku80 =[216].</p> <p>BER: APEX1 ↔[135]; PARP ↑[217]; PARP ↔[218]; XRCC1 =[58, 215].</p> <p>NER: ERCC1 =[58]; XPD =[58].</p> <p>MMR: MLH1 +[207]; MLH1 =[31]; MLH1 =[219]; MSH2 +[207]; MSH2 =[31].</p> <p>FA: FANCC =[91]; FANCC =[106]; FANCG =[91, 106].</p> <p>DRR: MGMT ↑[220]; MGMT ↔[221].</p> <p>TLS: POL<math>\epsilon</math> +[96].</p>
<b>Purine Analogs</b>	
6-Mercaptopurine	<p>BER: PARP ↑[222].</p> <p>MMR: MSH2 =[223].</p> <p>FA: FA +[224].</p>
6-Thioguanine	<p>HR: BRCA1 +[225]; BRCA2 +[225]; RAD51D +[226].</p> <p>NHEJ: WRN =[227].</p> <p>BER: PARP ↑[204]; POL<math>\beta</math> ↓[228].</p> <p>NER: CSA =[229]; CSB =[229]; XPA =[230].</p> <p>MMR: MLH1 =[80]; MSH2 =[79, 231]; MSH3 =[231].</p> <p>FA: FANCG +[124].</p> <p>DRR: MGMT ↑[232].</p>
Cladribine	NER: XPA +[233]; XPD +[233]; XPE +[233]; XPG +[233].



Table 3. Effect of DNA repair deffeciencies on the cytotoxicity of cytotoxic antibiotics.

CYTOTOXIC ANTIBIOTICS	
Anthracyclines	
Doxorubicin	<p>HR: BLM -[234]; BRCA1 =[49]; BRCA1 =[50]; BRCA2 +[133, 235, 236]; <i>RAD51p</i> +[237]; <i>RAD52p</i> +[237]; RAD54 =[133]; XRCC3 +[235].</p> <p>NHEJ: DNA-PKcs +[235]; Ku70 +[133, 238]; Ku80 +[238].</p> <p>BER: APEX1 ↑[65]; OGG1 ↑[239]; PARP =[136]; <i>POI.βeta</i> +[240]; XRCC1 =[235].</p> <p>NER: ERCC1 =[235]; XPA +[241, 242]; XPA =[133]; XPC +[241]; XPB =[235]; XPD -[243, 244]; XPF =[235]; XPG =[235].</p> <p>MMR: MLH1 +[235]; MLH1 =[79]; MLH1 -[31, 80]; MSH2 =[79]; MSH2 -[31]; <i>MSH3p</i> -[82]; <i>MSH6p</i> -[82].</p> <p>FA: FANCA =[245]; FANCC =[91]; FANCD2 +[245]; FANCG =[91].</p> <p>DRR: MGMT ↑[221].</p> <p>TLS: <i>POLEta</i> +[242]; RAD6B ↑[99].</p>
Idarubicin	<p>HR: BRCA2 +[246]; RAD51C +[246].</p> <p>NHEJ: DNA-PKcs +[246]; Ku80 +[246].</p>
Epirubicin	<p>NHEJ: DNA-PKcs =[61].</p> <p>MMR: MLH1 -[31]; MSH2 -[31].</p>
Mitoxantrone	<p>HR: BRCA2 +[247].</p> <p>NHEJ: DNA-PKcs ↑[248].</p> <p>MMR: MLH1 -[31]; MSH2 -[31].</p>
Valrubicin	<p>HR: <i>RECA</i> =[249].</p> <p>NER: <i>UVRA</i> =[249].</p>
Daunorubicin	MMR: MSH2 =[250].
Others cytotoxic antibiotics	
Dactinomycin	<p>HR: BRCA2 +[133]; RAD54 =[133].</p> <p>NHEJ: Ku70 +[133].</p> <p>NER: CSA -[251]; CSB -[251]; XPA =[133].</p> <p>FA: FA =[252].</p>
Bleomycin	<p>HR: BLM +[253]; BRCA1 +[36]; <i>PPMRE11</i> +[254]; <i>PPRAD50</i> +[254]; RAD51C +[54]; <i>RAD52p</i> +[237, 255, 256]; <i>RAD54p</i> +[257]; <i>RAD59p</i> =[258].</p> <p>NHEJ: Artemis +[259, 260]; DNA-PKcs +[128, 259]; Ku70 +[62, 238]; Ku80 +[128, 238]; LigIV +[261]; WRN +[203]; XRCC4 +[259].</p> <p>BER: <i>APN1p</i> +[262]; OGG1 ↑[263]; PARP +[136]; <i>POLβeta</i> +[264]; XRCC1 ↑[265].</p> <p>NER: <i>RAD3p</i> =[255]; <i>RAD10p</i> =[237, 266]; <i>RAD14p</i> =[266]; XPF +[267].</p> <p>MMR: MLH1 -[268].</p>

	<p>FA: FANCA +[269]; FANCB +[269]; FANCC +[269]; FANCD +[269, 270]; FANCE +[269]; FANCF +[269]; FANCG +[124, 269]; FANCH +[269].</p> <p>DRR: MGMT ↔[201, 271].</p> <p>TLS: <i>RAD6p</i> +[255, 257, 272]; <i>RAD18p</i> +[257]; <i>REV3p</i> =[257].</p>
Mitomycin C	<p>HR: BLM ↑[273, 274]; BLM ↔[275]; BRCA1 +[276, 277]; BRCA2 +[278]; MRE11 ↑[279]; RAD50 ↑[280]; RAD51C +[54]; RAD52 ↑[279]; RAD54 +[281, 282]; XRCC2 +[47, 215]; XRCC3 +[215].</p> <p>NHEJ: Artemis +[59, 283]; Artemis =[259]; DNA-PKcs =[128, 259]; DNA-PKcs = [284]; Ku70↑[279]; Ku70=[62]; Ku80 =[128]; LigIV ↑[279]; WRN ↑[285, 286]; XRCC4 +[59].</p> <p>BER: <i>APN1p</i> =[287]; MPG +[123, 144]; NTH1 ↔[73]; PARP +[136]; <i>POLβeta</i> +[67]; <i>POLLambda</i> =[288]; XRCC1 +[289].</p> <p>NER: ERCC1 +[146, 259, 290]; XPA +[291]; XPA =[47, 77]; XPB +[146]; XPD +[146]; XPF +[146, 292].</p> <p>MMR: MLH1 +[139]; MLH1 =[81]; MSH2 +[139]; PMS2 +[139].</p> <p>FA: FANCA +[269, 293]; FANCB +[269]; FANCC +[47, 91, 269, 293]; FANCD1 +[270, 293]; FANCD2 +[245, 270]; FANCE +[269]; FANCF +[269, 293]; FANCG +[91, 269, 293]; FANCH +[269].</p> <p>DRR: MGMT =[150]; MGMT -[94].</p> <p>TLS: <i>POLkappa</i> ↑[294]; RAD18 +[47]; REV3 +[47].</p>

Tabla 4. Effect of DNA repair deffeciencies on the cytotoxicity of topoisomerase inhibitors.

TOPOISOMERASE INHIBITORS	
Topoisomerase I inhibitors	
Camptothecin	<p>HR: BLM +[295, 296]; BLM =[297]; BRCA1 +[298]; BRCA2 +[298]; <i>MRE11p</i> +[299-301]; MUS81 +[302]; RAD51C +[54, 303]; <i>RAD52p</i> +[299, 300]; <i>RAD54p</i> +[299]; XRCC2 +[303]; XRCC3 +[303, 304].</p> <p>NHEJ: Artemis +[59, 60]; DNA-PKcs +[61, 303, 304]; DNA-PKcs -[305]; Ku70 -[305]; Ku80 =[306]; LigIV -[305]; WRN +[227, 296]; XRCC4 +[59].</p> <p>BER: APEX1 ↔[66]; <i>MAG1p</i> =[301]; NTH1 ↔[73]; PARP +[307]; POL<i>lambda</i> +[308]; POL<i>lambda</i> ↓[288]; <i>RAD27p</i> +[299, 309]; XRCC1 +[310, 311].</p> <p>NER: CSA +[312]; CSB +[312]; CUL4B +[313]; mus-43 =[266]; mus-44 =[266]; <i>RAD1p</i> +[300]; <i>RAD2p</i> +[299].</p> <p>MMR: MLH1 +[314]; MLH1 =[81]; MLH1 -[31]; MSH2 +[314, 315]; MSH2 =[31]; MSH6 =[314]; <i>PMS1p</i> =[316].</p> <p>FA: FANCB +[302]; FANCG +[124].</p> <p>DRR: MGMT ↑[317]; MGMT ↔[201].</p> <p>TLS: POL<i>eta</i> =[318]; POL<i>kappa</i> =[318]; <i>RAD6p</i> +[319]; RAD18 +[318, 320]; REV1 =[318]; REV3 =[318].</p>
Topotecan	<p>HR: XRCC2 +[202]; XRCC3 +[202].</p> <p>NHEJ: DNA-PKcs ↑[321]; Ku70 ↑[321]; WRN ↑[322, 323].</p> <p>BER: PARP-1 +[324].</p> <p>NER: CSB ↔[107]; ERCC1 +[202]; XPD =[202].</p> <p>MMR: MLH1 -[31]; MLH1 =[207]; MSH2 =[31].</p> <p>DRR: MGMT ↑[317].</p>
Irinotecan (SN38)	<p>HR: BRCA2 +[325]; RAD51 ↑[326]; RAD51 ↔[102].</p> <p>NHEJ: DNA-PKcs ↑[327]; WRN +[285].</p> <p>BER: MBD4 -[71]; PARP-1 ↑[328, 329].</p> <p>NER: ERCC1 ↔[102].</p> <p>MMR: MLH1 +[330]; MLH1 -[31, 207]; MSH2 =[31]; MSH2 -[207].</p> <p>DRR: MGMT ↑[317, 331].</p>
Topoisomerase II inhibitors	
Etoposide	<p>HR: BLM +[253, 296]; BLM =[297, 332]; BRCA1 +[36, 333]; BRCA2 +[246, 247, 333]; <i>MRE11p</i> +[334]; RAD50 ↔[335]; RAD51C +[246]; RAD52 +[336]; RAD54 +[337].</p> <p>NHEJ: Artemis +[60, 338]; Artemis =[59]; Artemis -[339]; DNA-PKcs +[246, 339]; DNA-PKcs =[340]; Ku70 +[238, 337, 340]; Ku80 +[238, 246, 306, 340]; LigIV +[261, 332, 337]; WRN +[227, 296]; XRCC4 +[59].</p> <p>BER: APEX1 ↑[341]; APEX1 ↔[66]; LigIII ↓[335]; FEN1 =[342]; OGG1 ↔[335]; PARP -[343]; POL<i>beta</i> ↑[344]; POL<i>lambda</i> +[308].</p>

	<p>NER: ERCC1 ↑[345]; HHR23A ↔[335]; XPA +[179]; XPC ↑[335, 346].</p> <p>MMR: MLH1 +[314]; MLH1 =[81]; MLH1 -[31, 79, 80]; MSH2 +[314]; MSH2 -[31, 79]; MSH6 =[314].</p> <p>FA: FANCA =[245]; FANCC =[91, 106]; FANCD2 +[245]; FANCG +[124]; FANCG =[91, 106].</p> <p>DRR: MGMT ↔[201].</p> <p>TLS: RAD18 +[320].</p>
Teniposide	BER: PARP ↔[347].

Table 5. Effect of DNA repair deffeciencies on the cytotoxicity of antimitotic agents.

<b>ANTIMITOTIC AGENTS</b>	
<b>Vinca alkaloids</b>	
Vincristine	<p>HR: BRCA1 ↓[348].</p> <p>NHEJ: DNA-PKcs ↑[349]; Ku70 +[238]; Ku80 +[238].</p> <p>BER: PARP ↓[350].</p> <p>NER: ERCC1 ↔[351]; XPA +[179]; XPD ↔[351].</p> <p>MMR: MSH2 =[32, 250].</p>
Vinblastine	<p>BER: PARP ↓[352].</p> <p>FA: FANCC =[91]; FANCG =[91].</p> <p>DRR: MGMT ↔[201].</p>
Vinorelbine	<p>HR: BRCA1 -[36]; RAD51 ↔[102].</p> <p>NER: ERCC1 ↔[102].</p> <p>MMR: MSH2 +[32].</p>
<b>Taxanes</b>	
Paclitaxel	<p>HR: BRCA1 -[36, 50]; BRCA2 =[247]; RAD51 ↔[102]; XRCC2 =[57].</p> <p>NHEJ: Ku70 +[238]; Ku70 =[62]; Ku80 +[238].</p> <p>BER: XRCC1 ↔[265].</p> <p>NER: ERCC1 ↔[102]; XPD ↑[353].</p> <p>MMR: MLH1 =[79, 80]; MSH2 =[79].</p> <p>FA: FANCC =[91]; FANCG =[91].</p> <p>DRR: MGMT ↔[221].</p>
Docetaxel	<p>HR: BRCA1 =[49]; BRCA2 ↑[33].</p> <p>NHEJ: DNA-PKcs -[61].</p> <p>MMR: MLH1 =[31]; MSH2 =[31].</p>

Table 6. Effect of DNA repair deffeciencies on the cytotoxicity of Hormonal and targeted therapies.

<b>HORMONAL AND TARGETED THERAPIES</b>	
<b>Glucocorticoids</b>	
Prednisolone	BER: PARP ↓[350]. MMR: MSH2 =[250]. DRR: MGMT ↔[201].
Dexamethasone	MMR: MSH2 =[250].
Prednisone	MMR: MSH6 ↓[354].
<b>Antiestrogens</b>	
Tamoxifen	HR: BRCA1 ↓[355]; BRCA1 ↔[356]; RAD54 +[42]. NHEJ: Ku70 +[42]. BER: MBD4 ↑[357]. NER: XPA =[42]. MMR: MLH1 =[80]. TLS: POL <i>kappa</i> +[42]; RAD18 +[42]; REV3 +[42].
Fulvestrant	HR: BRCA1 ↓[43].
<b>Protein kinase inhibitors</b>	
Sunitinib	DRR: MGMT -[358].
Gefitinib	HR: RAD51 ↑[359-361]. DRR: MGMT =[362].
Imatinib	BER: PARP ↓[363].
Erlotinib	HR: BRCA1 ↑[38, 364].
<b>Monoclonal antibodies</b>	
Cetuximab	BER: PARP ↑[37].

Table 7. Effect of DNA repair deffeciencies on the cytotoxicity of other anticancer drugs.

OTHER ANTICANCER DRUGS	
Bortezomib	BER: PARP ↑[365].
L-asparaginase	BER: PARP ↓[350].  MMR: MSH2 =[250].
Hydroxyurea	HR: BLM +[46, 332, 366]; BLM =[253]; BLM -[367]; BRCA2 =[247]; MRAD1 +[368]; MRE11p +[369]; MRE11p =[301]; RAD50p +[370]; RAD51D =[371]; RAD22A +[372]; RHP54 +[372]; XRCC2 +[371, 373]; XRCC3 +[374].  NHEJ: Artemis -[59]; DNA-PKcs +[374]; LigIV =[332]; Ku80 +[375]; Mus-51 =[376]; Pku70 +[377]; WRN =[46]; XRCC4 +[59, 375]; Yku70 +[369].  BER: MAG1p +[301]; PARP +[378].  NER: Mus-43 =[266]; Mus-44 =[266]; RHP23 -[379]; RNA PolIII +[380].  MMR: MLH1 +[207].  FA: FANCA =[381]; FANCB +[302]; FANCD =[381]; FANCG +[124]; FANCI +[382].  DRR: MGMT +[182].  TLS: POLeta =[383]; POLkappa =[383]; RAD6p +[384]; RAD18 =[385].
Arsenic trioxide	NER: XPA +[386]; XPC ↑[387].
Trabectedin	HR: BRCA2 +[388, 389]; MRE11p +[389]; RAD22A +[390]; RAD52p +[389, 391]; RAD51C +[388]; RAD54 +[390]; XRCC2 +[388]; XRCC3 +[388, 389].  NHEJ: DNA-PKcs +[389, 391]; DNA-PKcs =[388]; Ku80 =[388]; Yku70p +[389].  BER: APN1p -[392]; APN2p -[392]; MAG1p -[392]; OGG1p -[392].  NER: ERCC1 -[389, 391, 393, 394]; CSA -[395]; CSB -[391, 395]; RAD4p =[392]; RAD13 -[390]; RAD16 -[390]; XPA -[389, 391, 395]; XPB - [391, 393, 394]; XPC =[395]; XPD -[393, 395]; XPF -[393, 395]; XPG -[393, 395].  MMR: MLH1 =[391]; MSH2p =[389].  FA: FANCA +[293]; FANCC +[293]; FANCD1 +[293]; FANCF +[293]; FANCG +[293].  TLS: RAD6p =[389]; RAD18p =[389]; REV3p =[389]; REV3p -[392].
Thalidomide	NER: CUL4A ↓ [396].
Vorinostat	MMR: MLH1 =[397].
Tretinoin	BER: APEX1 ↑[398]; PARP ↑[399].

## References

- [1] Lord, C.J.; Ashworth, A. The DNA damage response and cancer therapy *Nature*. 2012, *481*, 287-294.
- [2] Basu, B.; Yap, T.A.; Molife, L.R.; de Bono, J.S. Targeting the DNA damage response in oncology: past, present and future perspectives *Curr. Opin. Oncol.* 2012, *24*, 316-324.
- [3] Vogelstein, B.; Kinzler, K.W. Cancer genes and the pathways they control *Nat. Med.* 2004, *10*, 789-799.
- [4] Luo, J.; Solimini, N.L.; Elledge, S.J. Principles of cancer therapy: oncogene and non-oncogene addiction *Cell*. 2009, *136*, 823-837.
- [5] Helleday, T.; Petermann, E.; Lundin, C.; Hodgson, B.; Sharma, R.A. DNA repair pathways as targets for cancer therapy *Nat. Rev. Cancer*. 2008, *8*, 193-204.
- [6] Masters, J.R.; Koberle, B. Curing metastatic cancer: lessons from testicular germ-cell tumours *Nat. Rev. Cancer*. 2003, *3*, 517-525.
- [7] Postel-Vinay, S.; Vanhecke, E.; Olaussen, K.A.; Lord, C.J.; Ashworth, A.; Soria, J.C. The potential of exploiting DNA-repair defects for optimizing lung cancer treatment *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 2012, *9*, 144-155.
- [8] Ciccia, A.; Elledge, S.J. The DNA damage response: making it safe to play with knives *Mol. Cell*. 2010, *40*, 179-204.
- [9] Giglia-Mari, G.; Zotter, A.; Vermeulen, W. DNA damage response *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2011, *3*, a000745.
- [10] Helleday, T.; Petermann, E.; Lundin, C.; Hodgson, B.; Sharma, R.A. DNA repair pathways as targets for cancer therapy *Nat. Rev. Cancer*. 2008, *8*, 193-204.
- [11] Helleday, T. Homologous recombination in cancer development, treatment and development of drug resistance *Carcinogenesis*. 2010, *31*, 955-960.
- [12] Aziz, K.; Newshean, S.; Pantelias, G.; Iliakis, G.; Gorgoulis, V.G.; Georgakilas, A.G. Targeting DNA damage and repair: embracing the pharmacological era for successful cancer therapy *Pharmacol. Ther.* 2012, *133*, 334-350.
- [13] San Filippo, J.; Sung, P.; Klein, H. Mechanism of eukaryotic homologous recombination *Annu. Rev. Biochem.* 2008, *77*:229-57., 229-257.
- [14] Sonoda, E.; Takata, M.; Yamashita, Y.M.; Morrison, C.; Takeda, S. Homologous DNA recombination in vertebrate cells *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2001, *98*, 8388-8394.
- [15] Christmann, M.; Tomicic, M.T.; Roos, W.P.; Kaina, B. Mechanisms of human DNA repair: an update *Toxicology*. 2003, *193*, 3-34.



- [16] Miyagawa, K. Clinical relevance of the homologous recombination machinery in cancer therapy *Cancer Sci.* 2008, *99*, 187-194.
- [17] Pallis, A.G.; Karamouzis, M.V. DNA repair pathways and their implication in cancer treatment *Cancer Metastasis Rev.* 2010, *29*, 677-685.
- [18] Kennedy, R.D.; Chen, C.C.; Stuckert, P.; Archila, E.M.; De la Vega, M.A.; Moreau, L.A.; Shimamura, A.; D'Andrea, A.D. Fanconi anemia pathway-deficient tumor cells are hypersensitive to inhibition of ataxia telangiectasia mutated *J. Clin. Invest.* 2007, *117*, 1440-1449.
- [19] Xie, K.; Doles, J.; Hemann, M.T.; Walker, G.C. Error-prone translesion synthesis mediates acquired chemoresistance *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2010, *107*, 20792-20797.
- [20] Esteller, M.; Garcia-Foncillas, J.; Andion, E.; Goodman, S.N.; Hidalgo, O.F.; Vanaclocha, V.; Baylin, S.B.; Herman, J.G. Inactivation of the DNA-repair gene MGMT and the clinical response of gliomas to alkylating agents *N. Engl. J. Med.* 2000, *343*, 1350-1354.
- [21] Paz, M.F.; Yaya-Tur, R.; Rojas-Marcos, I.; Reynes, G.; Pollan, M.; Aguirre-Cruz, L.; Garcia-Lopez, J.L.; Piquer, J.; Safont, M.J.; Balana, C.; Sanchez-Cespedes, M.; Garcia-Villanueva, M.; Arribas, L.; Esteller, M. CpG island hypermethylation of the DNA repair enzyme methyltransferase predicts response to temozolomide in primary gliomas *Clin. Cancer Res.* 2004, *10*, 4933-4938.
- [22] Olaussen, K.A.; Dunant, A.; Fouret, P.; Brambilla, E.; Andre, F.; Haddad, V.; Taranchon, E.; Filipits, M.; Pirker, R.; Popper, H.H.; Stahel, R.; Sabatier, L.; Pignon, J.P.; Tursz, T.; Le Chevalier, T.; Soria, J.C. DNA repair by ERCC1 in non-small-cell lung cancer and cisplatin-based adjuvant chemotherapy *N. Engl. J. Med.* 2006, *355*, 983-991.
- [23] Shirota, Y.; Stoecklacher, J.; Brabender, J.; Xiong, Y.P.; Uetake, H.; Danenberg, K.D.; Groshen, S.; Tsao-Wei, D.D.; Danenberg, P.V.; Lenz, H.J. ERCC1 and thymidylate synthase mRNA levels predict survival for colorectal cancer patients receiving combination oxaliplatin and fluorouracil chemotherapy *J. Clin. Oncol.* 2001, *19*, 4298-4304.
- [24] Metzger, R.; Leichman, C.G.; Danenberg, K.D.; Danenberg, P.V.; Lenz, H.J.; Hayashi, K.; Groshen, S.; Salonga, D.; Cohen, H.; Laine, L.; Crookes, P.; Silberman, H.; Baranda, J.; Konda, B.; Leichman, L. ERCC1 mRNA levels complement thymidylate synthase mRNA levels in predicting response and survival for gastric cancer patients receiving combination cisplatin and fluorouracil chemotherapy *J. Clin. Oncol.* 1998, *16*, 309-316.
- [25] Dabholkar, M.; Vionnet, J.; Bostick-Bruton, F.; Yu, J.J.; Reed, E. Messenger RNA levels of XPAC and ERCC1 in ovarian cancer tissue correlate with response to platinum-based chemotherapy *J. Clin. Invest.* 1994, *94*, 703-708.
- [26] Lord, R.V.; Brabender, J.; Gandara, D.; Alberola, V.; Camps, C.; Domine, M.; Cardenal, F.; Sanchez, J.M.; Gumerlock, P.H.; Taron, M.; Sanchez, J.J.; Danenberg, K.D.; Danenberg, P.V.; Rosell, R. Low ERCC1 expression correlates

- with prolonged survival after cisplatin plus gemcitabine chemotherapy in non-small cell lung cancer *Clin. Cancer Res.* 2002, 8, 2286-2291.
- [27] Taron, M.; Rosell, R.; Felip, E.; Mendez, P.; Souglakos, J.; Ronco, M.S.; Queralt, C.; Majo, J.; Sanchez, J.M.; Sanchez, J.J.; Maestre, J. BRCA1 mRNA expression levels as an indicator of chemoresistance in lung cancer *Hum. Mol. Genet.* 2004, 13, 2443-2449.
  - [28] Weberpals, J.; Garbuio, K.; O'Brien, A.; Clark-Knowles, K.; Doucette, S.; Antoniouk, O.; Goss, G.; Dimitroulakos, J. The DNA repair proteins BRCA1 and ERCC1 as predictive markers in sporadic ovarian cancer *Int. J. Cancer.* 2009, 124, 806-815.
  - [29] Fink, D.; Aebi, S.; Howell, S.B. The role of DNA mismatch repair in drug resistance *Clin. Cancer Res.* 1998, 4, 1-6.
  - [30] Martin, L.P.; Hamilton, T.C.; Schilder, R.J. Platinum resistance: the role of DNA repair pathways *Clin. Cancer Res.* 2008, 14, 1291-1295.
  - [31] Fedier, A.; Schwarz, V.A.; Walt, H.; Carpin, R.D.; Haller, U.; Fink, D. Resistance to topoisomerase poisons due to loss of DNA mismatch repair *Int. J. Cancer.* 2001, 93, 571-576.
  - [32] Hanley, M.L.; Elion, G.B.; Colvin, O.M.; Modrich, P.L.; Keir, S.; Adams, D.J.; Bigner, D.D.; Friedman, H.S. Therapeutic efficacy of vinorelbine against pediatric and adult central nervous system tumors *Cancer Chemother. Pharmacol.* 1998, 42, 479-482.
  - [33] Egawa, C.; Miyoshi, Y.; Takamura, Y.; Taguchi, T.; Tamaki, Y.; Noguchi, S. Decreased expression of BRCA2 mRNA predicts favorable response to docetaxel in breast cancer *Int. J. Cancer.* 2001, 95, 255-259.
  - [34] Jiang, W.; Lu, Y.; Chen, Z.; Chen, S.; Zhang, M.; Jin, L.; Lou, J.; He, J. Studying the genotoxicity of vincristine on human lymphocytes using comet assay, micronucleus assay and TCR gene mutation test in vitro *Toxicology.* 2008, 252, 113-117.
  - [35] Branham, M.T.; Nadin, S.B.; Vargas-Roig, L.M.; Ciocca, D.R. DNA damage induced by paclitaxel and DNA repair capability of peripheral blood lymphocytes as evaluated by the alkaline comet assay *Mutat. Res.* 2004, 560, 11-17.
  - [36] Quinn, J.E.; Kennedy, R.D.; Mullan, P.B.; Gilmore, P.M.; Carty, M.; Johnston, P.G.; Harkin, D.P. BRCA1 functions as a differential modulator of chemotherapy-induced apoptosis *Cancer Res.* 2003, 63, 6221-6228.
  - [37] Newshean, S.; Bonner, J.A.; Lobuglio, A.F.; Trummell, H.; Whitley, A.C.; Dobelbower, M.C.; Yang, E.S. Cetuximab augments cytotoxicity with poly (adp-ribose) polymerase inhibition in head and neck cancer *PLoS. One.* 2011, 6, e24148.
  - [38] Li, L.; Wang, H.; Yang, E.S.; Arteaga, C.L.; Xia, F. Erlotinib attenuates homologous recombinational repair of chromosomal breaks in human breast cancer cells *Cancer Res.* 2008, 68, 9141-9146.

- [39] Carthew, P.; Martin, E.A.; White, I.N.; De Matteis, F.; Edwards, R.E.; Dorman, B.M.; Heydon, R.T.; Smith, L.L. Tamoxifen induces short-term cumulative DNA damage and liver tumors in rats: promotion by phenobarbital *Cancer Res.* 1995, *55*, 544-547.
- [40] Gaikwad, N.W.; Bodell, W.J. Peroxidase-mediated dealkylation of tamoxifen, detected by electrospray ionization-mass spectrometry, and activation to form DNA adducts *Free Radic. Biol. Med.* 2012, *52*, 340-347.
- [41] Martin, E.A.; Brown, K.; Gaskell, M.; Al Azzawi, F.; Garner, R.C.; Boocock, D.J.; Mattock, E.; Pring, D.W.; Dingley, K.; Turteltaub, K.W.; Smith, L.L.; White, I.N. Tamoxifen DNA damage detected in human endometrium using accelerator mass spectrometry *Cancer Res.* 2003, *63*, 8461-8465.
- [42] Mizutani, A.; Okada, T.; Shibutani, S.; Sonoda, E.; Hohegger, H.; Nishigori, C.; Miyachi, Y.; Takeda, S.; Yamazoe, M. Extensive chromosomal breaks are induced by tamoxifen and estrogen in DNA repair-deficient cells *Cancer Res.* 2004, *64*, 3144-3147.
- [43] Hosey, A.M.; Gorski, J.J.; Murray, M.M.; Quinn, J.E.; Chung, W.Y.; Stewart, G.E.; James, C.R.; Farragher, S.M.; Mulligan, J.M.; Scott, A.N.; Dervan, P.A.; Johnston, P.G.; Couch, F.J.; Daly, P.A.; Kay, E.; McCann, A.; Mullan, P.B.; Harkin, D.P. Molecular basis for estrogen receptor alpha deficiency in BRCA1-linked breast cancer *J. Natl. Cancer Inst.* 2007, *99*, 1683-1694.
- [44] Feuerhahn, S.; Giraudon, C.; Martinez-Diez, M.; Bueren-Calabuig, J.A.; Galmarini, C.M.; Gago, F.; Egly, J.M. XPF-dependent DNA breaks and RNA polymerase II arrest induced by antitumor DNA interstrand crosslinking-mimetic alkaloids *Chem. Biol.* 2011, *18*, 988-999.
- [45] Petermann, E.; Orta, M.L.; Issaeva, N.; Schultz, N.; Helleday, T. Hydroxyurea-stalled replication forks become progressively inactivated and require two different RAD51-mediated pathways for restart and repair *Mol. Cell.* 2010, *37*, 492-502.
- [46] Mao, F.J.; Sidorova, J.M.; Lauper, J.M.; Emond, M.J.; Monnat, R.J. The human WRN and BLM RecQ helicases differentially regulate cell proliferation and survival after chemotherapeutic DNA damage *Cancer Res.* 2010, *70*, 6548-6555.
- [47] Nojima, K.; Hohegger, H.; Saberi, A.; Fukushima, T.; Kikuchi, K.; Yoshimura, M.; Orelli, B.J.; Bishop, D.K.; Hirano, S.; Ohzeki, M.; Ishiai, M.; Yamamoto, K.; Takata, M.; Arakawa, H.; Buerstedde, J.M.; Yamazoe, M.; Kawamoto, T.; Araki, K.; Takahashi, J.A.; Hashimoto, N.; Takeda, S.; Sonoda, E. Multiple repair pathways mediate tolerance to chemotherapeutic cross-linking agents in vertebrate cells *Cancer Res.* 2005, *65*, 11704-11711.
- [48] Dhillon, K.K.; Swisher, E.M.; Taniguchi, T. Secondary mutations of BRCA1/2 and drug resistance *Cancer Sci.* 2010, 10-7006.
- [49] Alli, E.; Sharma, V.B.; Hartman, A.R.; Lin, P.S.; McPherson, L.; Ford, J.M. Enhanced sensitivity to cisplatin and gemcitabine in Brca1-deficient murine mammary epithelial cells *BMC. Pharmacol.* 2011, *19*, 7.

- [50] Tassone, P.; Tagliaferri, P.; Perricelli, A.; Blotta, S.; Quaresima, B.; Martelli, M.L.; Goel, A.; Barbieri, V.; Costanzo, F.; Boland, C.R.; Venuta, S. BRCA1 expression modulates chemosensitivity of BRCA1-defective HCC1937 human breast cancer cells *Br. J. Cancer*. 2003, 88, 1285-1291.
- [51] Tran, H.M.; Shi, G.; Li, G.; Carney, J.P.; O'Malley, B.; Li, D. Mutant Nbs1 enhances cisplatin-induced DNA damage and cytotoxicity in head and neck cancer *Otolaryngol. Head Neck Surg*. 2004, 131, 477-484.
- [52] Abuzeid, W.M.; Jiang, X.; Shi, G.; Wang, H.; Paulson, D.; Araki, K.; Jungreis, D.; Carney, J.; O'Malley, B.W., Jr.; Li, D. Molecular disruption of RAD50 sensitizes human tumor cells to cisplatin-based chemotherapy *J. Clin. Invest*. 2009, 119, 1974-1985.
- [53] Takata, M.; Sasaki, M.S.; Sonoda, E.; Fukushima, T.; Morrison, C.; Albala, J.S.; Swagemakers, S.M.; Kanaar, R.; Thompson, L.H.; Takeda, S. The Rad51 paralog Rad51B promotes homologous recombinational repair *Mol. Cell Biol*. 2000, 20, 6476-6482.
- [54] Godthelp, B.C.; Wiegant, W.W.; Duijn-Goedhart, A.; Scharer, O.D.; van Buul, P.P.; Kanaar, R.; Zdzienicka, M.Z. Mammalian Rad51C contributes to DNA cross-link resistance, sister chromatid cohesion and genomic stability *Nucleic Acids Res*. 2002, 30, 2172-2182.
- [55] Takata, M.; Sasaki, M.S.; Tachiiri, S.; Fukushima, T.; Sonoda, E.; Schild, D.; Thompson, L.H.; Takeda, S. Chromosome instability and defective recombinational repair in knockout mutants of the five Rad51 paralogs *Mol. Cell Biol*. 2001, 21, 2858-2866.
- [56] Raaphorst, G.P.; Leblanc, M.; Li, L.F. A comparison of response to cisplatin, radiation and combined treatment for cells deficient in recombination repair pathways *Anticancer Res*. 2005, 25, 53-58.
- [57] Tsaryk, R.; Fabian, K.; Thacker, J.; Kaina, B. Xrcc2 deficiency sensitizes cells to apoptosis by MNNG and the alkylating anticancer drugs temozolomide, fotemustine and mafosfamide *Cancer Lett*. 2006, 239, 305-313.
- [58] Crul, M.; van Waardenburg, R.C.; Boecx, S.; van Eijndhoven, M.A.; Pluim, D.; Beijnen, J.H.; Schellens, J.H. DNA repair mechanisms involved in gemcitabine cytotoxicity and in the interaction between gemcitabine and cisplatin *Biochem. Pharmacol*. 2003, 65, 275-282.
- [59] Katsube, T.; Mori, M.; Tsuji, H.; Shiomi, T.; Shiomi, N.; Onoda, M. Differences in sensitivity to DNA-damaging Agents between XRCC4- and Artemis-deficient human cells *J. Radiat. Res. (Tokyo)*. 2011, 52, 415-424.
- [60] Darroudi, F.; Wiegant, W.; Meijers, M.; Friedl, A.A.; van der, B.M.; Fomina, J.; van Dongen, J.J.; van Gent, D.C.; Zdzienicka, M.Z. Role of Artemis in DSB repair and guarding chromosomal stability following exposure to ionizing radiation at different stages of cell cycle *Mutat. Res*. 2007, 615, 111-124.

- [61] Fedier, A.; Moawad, A.; Haller, U.; Fink, D. p53-deficient cells display increased sensitivity to anthracyclines after loss of the catalytic subunit of the DNA-dependent protein kinase *Int. J. Oncol.* 2003, 23, 1431-1437.
- [62] Omori, S.; Takiguchi, Y.; Suda, A.; Sugimoto, T.; Miyazawa, H.; Takiguchi, Y.; Tanabe, N.; Tatsumi, K.; Kimura, H.; Pardington, P.E.; Chen, F.; Chen, D.J.; Kuriyama, T. Suppression of a DNA double-strand break repair gene, Ku70, increases radio- and chemosensitivity in a human lung carcinoma cell line *DNA Repair (Amst)*. 2002, 1, 299-310.
- [63] Jiang, Y.; Guo, C.; Vasko, M.R.; Kelley, M.R. Implications of apurinic/apyrimidinic endonuclease in reactive oxygen signaling response after cisplatin treatment of dorsal root ganglion neurons *Cancer Res.* 2008, 68, 6425-6434.
- [64] Wang, D.; Xiang, D.B.; Yang, X.Q.; Chen, L.S.; Li, M.X.; Zhong, Z.Y.; Zhang, Y.S. APE1 overexpression is associated with cisplatin resistance in non-small cell lung cancer and targeted inhibition of APE1 enhances the activity of cisplatin in A549 cells *Lung Cancer*. 2009, 66, 298-304.
- [65] Chattopadhyay, R.; Das, S.; Maiti, A.K.; Boldogh, I.; Xie, J.; Hazra, T.K.; Kohno, K.; Mitra, S.; Bhakat, K.K. Regulatory role of human AP-endonuclease (APE1/Ref-1) in YB-1-mediated activation of the multidrug resistance gene MDR1 *Mol. Cell Biol.* 2008, 28, 7066-7080.
- [66] McNeill, D.R.; Wilson, D.M., III A dominant-negative form of the major human abasic endonuclease enhances cellular sensitivity to laboratory and clinical DNA-damaging agents *Mol. Cancer Res.* 2007, 5, 61-70.
- [67] Ochs, K.; Sobol, R.W.; Wilson, S.H.; Kaina, B. Cells deficient in DNA polymerase beta are hypersensitive to alkylating agent-induced apoptosis and chromosomal breakage *Cancer Res.* 1999, 59, 1544-1551.
- [68] Horton, J.K.; Joyce-Gray, D.F.; Pachkowski, B.F.; Swenberg, J.A.; Wilson, S.H. Hypersensitivity of DNA polymerase beta null mouse fibroblasts reflects accumulation of cytotoxic repair intermediates from site-specific alkyl DNA lesions *DNA Repair (Amst)*. 2003, 2, 27-48.
- [69] Yang, J.; Parsons, J.; Nicolay, N.H.; Caporali, S.; Harrington, C.F.; Singh, R.; Finch, D.; D'Atri, S.; Farmer, P.B.; Johnston, P.G.; McKenna, W.G.; Dianov, G.; Sharma, R.A. Cells deficient in the base excision repair protein, DNA polymerase beta, are hypersensitive to oxaliplatin chemotherapy *Oncogene*. 2010, 29, 463-468.
- [70] Kothandapani, A.; Dangeti, V.S.; Brown, A.R.; Banze, L.A.; Wang, X.H.; Sobol, R.W.; Patrick, S.M. Novel role of base excision repair (BER) in mediating cisplatin cytotoxicity *J. Biol. Chem.* 2011.
- [71] Cortellino, S.; Turner, D.; Masciullo, V.; Schepis, F.; Albino, D.; Daniel, R.; Skalka, A.M.; Meropol, N.J.; Alberti, C.; Larue, L.; Bellacosa, A. The base excision repair enzyme MED1 mediates DNA damage response to antitumor drugs and is associated with mismatch repair system integrity *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2003, 100, 15071-15076.



- [72] Sansom, O.J.; Zabkiewicz, J.; Bishop, S.M.; Guy, J.; Bird, A.; Clarke, A.R. MBD4 deficiency reduces the apoptotic response to DNA-damaging agents in the murine small intestine *Oncogene*. 2003, 22, 7130-7136.
- [73] Guay, D.; Garand, C.; Reddy, S.; Schmutte, C.; Lebel, M. The human endonuclease III enzyme is a relevant target to potentiate cisplatin cytotoxicity in Y-box-binding protein-1 overexpressing tumor cells *Cancer Sci*. 2008, 99, 762-769.
- [74] Furuta, T.; Ueda, T.; Aune, G.; Sarasin, A.; Kraemer, K.H.; Pommier, Y. Transcription-coupled nucleotide excision repair as a determinant of cisplatin sensitivity of human cells *Cancer Res*. 2002, 62, 4899-4902.
- [75] Dunkern, T.R.; Fritz, G.; Kaina, B. Cisplatin-induced apoptosis in 43-3B and 27-1 cells defective in nucleotide excision repair *Mutat. Res*. 2001, 486, 249-258.
- [76] Chiang, Y.Y.; Chen, S.L.; Hsiao, Y.T.; Huang, C.H.; Lin, T.Y.; Chiang, I.P.; Hsu, W.H.; Chow, K.C. Nuclear expression of dynamin-related protein 1 in lung adenocarcinomas *Mod. Pathol*. 2009, 22, 1139-1150.
- [77] Plooy, A.C.; van Dijk, M.; Berends, F.; Lohman, P.II. Formation and repair of DNA interstrand cross-links in relation to cytotoxicity and unscheduled DNA synthesis induced in control and mutant human cells treated with cis-diamminedichloroplatinum(II) *Cancer Res*. 1985, 45, 4178-4184.
- [78] Fujiwara, Y.; Nakamura, M.; Yokoo, S. A new anticancer platinum compound, (-)-(R)-2-aminomethyl-pyrrolidine(1,1-cyclobutanedicarboxylato) platinum(II): DNA interstrand crosslinking, repair and lethal effects in normal human, Fanconi's anaemia and xeroderma pigmentosum cells *Br. J. Cancer*. 1993, 67, 1285-1292.
- [79] Aebi, S.; Fink, D.; Gordon, R.; Kim, H.K.; Zheng, H.; Fink, J.L.; Howell, S.B. Resistance to cytotoxic drugs in DNA mismatch repair-deficient cells *Clin. Cancer Res*. 1997, 3, 1763-1767.
- [80] Fink, D.; Nebel, S.; Norris, P.S.; Aebi, S.; Kim, H.K.; Haas, M.; Howell, S.B. The effect of different chemotherapeutic agents on the enrichment of DNA mismatch repair-deficient tumour cells *Br. J. Cancer*. 1998, 77, 703-708.
- [81] Papouli, E.; Cejka, P.; Jiricny, J. Dependence of the cytotoxicity of DNA-damaging agents on the mismatch repair status of human cells *Cancer Res*. 2004, 64, 3391-3394.
- [82] Durant, S.T.; Morris, M.M.; Illand, M.; McKay, H.J.; McCormick, C.; Hirst, G.L.; Borts, R.H.; Brown, R. Dependence on RAD52 and RAD1 for anticancer drug resistance mediated by inactivation of mismatch repair genes *Curr. Biol*. 1999, 9, 51-54.
- [83] Toft, N.J.; Winton, D.J.; Kelly, J.; Howard, L.A.; Dekker, M.; te, R.H.; Arends, M.J.; Wyllie, A.H.; Margison, G.P.; Clarke, A.R. Msh2 status modulates both apoptosis and mutation frequency in the murine small intestine *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*. 1999, 96, 3911-3915.

- [84] Fink, D.; Nebel, S.; Aebi, S.; Nehme, A.; Howell, S. Loss of DNA mismatch repair due to knockout of MSH2 or PMS2 results in resistance to cisplatin and carboplatin *Int. J. Oncol.* 1997, *11*, 539-542.
- [85] Takahashi, M.; Koi, M.; Balaguer, F.; Boland, C.R.; Goel, A. MSH3 mediates sensitization of colorectal cancer cells to cisplatin, oxaliplatin, and a poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor *J. Biol. Chem.* 2011, *286*, 12157-12165.
- [86] Beljanski, V.; Marzilli, L.G.; Doetsch, P.W. DNA damage-processing pathways involved in the eukaryotic cellular response to anticancer DNA cross-linking drugs *Mol. Pharmacol.* 2004, *65*, 1496-1506.
- [87] Francia, G.; Man, S.; Teicher, B.; Grasso, L.; Kerbel, R.S. Gene expression analysis of tumor spheroids reveals a role for suppressed DNA mismatch repair in multicellular resistance to alkylating agents *Mol. Cell Biol.* 2004, *24*, 6837-6849.
- [88] Kachnic, L.A.; Li, L.; Fournier, L.; Willers, H. Fanconi anemia pathway heterogeneity revealed by cisplatin and oxaliplatin treatments *Cancer Lett.* 2010, *292*, 73-79.
- [89] Ferrer, M.; de Winter, J.P.; Mastenbroek, D.C.; Curiel, D.T.; Gerritsen, W.R.; Giaccone, G.; Kruyt, F.A. Chemosensitizing tumor cells by targeting the Fanconi anemia pathway with an adenovirus overexpressing dominant-negative FANCA *Cancer Gene Ther.* 2004, *11*, 539-546.
- [90] Matsushita, N.; Kitao, H.; Ishiai, M.; Nagashima, N.; Hirano, S.; Okawa, K.; Ohta, T.; Yu, D.S.; McHugh, P.J.; Hickson, I.D.; Venkitaraman, A.R.; Kurumizaka, H.; Takata, M. A FancD2-monoubiquitin fusion reveals hidden functions of Fanconi anemia core complex in DNA repair *Mol. Cell.* 2005, *19*, 841-847.
- [91] van der Heijden, M.S.; Brody, J.R.; Dezentje, D.A.; Gallmeier, E.; Cunningham, S.C.; Swartz, M.J.; DeMarzo, A.M.; Offerhaus, G.J.; Isacoff, W.H.; Hruban, R.H.; Kern, S.E. In vivo therapeutic responses contingent on Fanconi anemia/BRCA2 status of the tumor *Clin. Cancer Res.* 2005, *11*, 7508-7515.
- [92] Taniguchi, T.; Tischkowitz, M.; Ameziane, N.; Hodgson, S.V.; Mathew, C.G.; Joenje, H.; Mok, S.C.; D'Andrea, A.D. Disruption of the Fanconi anemia-BRCA pathway in cisplatin-sensitive ovarian tumors *Nat. Med.* 2003, *9*, 568-574.
- [93] Preuss, I.; Thust, R.; Kaina, B. Protective effect of O6-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) on the cytotoxic and recombinogenic activity of different antineoplastic drugs *Int. J. Cancer.* 1996, *65*, 506-512.
- [94] Passagne, I.; Evrard, A.; Depeille, P.; Cuq, P.; Cupissol, D.; Vian, L. O(6)-methylguanine DNA-methyltransferase (MGMT) overexpression in melanoma cells induces resistance to nitrosoureas and temozolomide but sensitizes to mitomycin C *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2006, *211*, 97-105.
- [95] Fishel, M.L.; Delaney, S.M.; Friesen, L.D.; Hansen, R.J.; Zuhowski, E.G.; Moschel, R.C.; Egorin, M.J.; Dolan, M.E. Enhancement of platinum-induced cytotoxicity by O6-benzylguanine *Mol. Cancer Ther.* 2003, *2*, 633-640.

- [96] Chen, Y.W.; Cleaver, J.E.; Hanaoka, F.; Chang, C.F.; Chou, K.M. A novel role of DNA polymerase eta in modulating cellular sensitivity to chemotherapeutic agents *Mol. Cancer Res.* 2006, 4, 257-265.
- [97] Cruet-Hennequart, S.; Glynn, M.T.; Murillo, L.S.; Coyne, S.; Carty, M.P. Enhanced DNA-PK-mediated RPA2 hyperphosphorylation in DNA polymerase eta-deficient human cells treated with cisplatin and oxaliplatin *DNA Repair (Amst)*. 2008, 7, 582-596.
- [98] Albertella, M.R.; Green, C.M.; Lehmann, A.R.; O'Connor, M.J. A role for polymerase eta in the cellular tolerance to cisplatin-induced damage *Cancer Res.* 2005, 65, 9799-9806.
- [99] Lyakhovich, A.; Shekhar, M.P. RAD6B overexpression confers chemoresistance: RAD6 expression during cell cycle and its redistribution to chromatin during DNA damage-induced response *Oncogene*. 2004, 23, 3097-3106.
- [100] Okuda, T.; Lin, X.; Trang, J.; Howell, S.B. Suppression of hREV1 expression reduces the rate at which human ovarian carcinoma cells acquire resistance to cisplatin *Mol. Pharmacol.* 2005, 67, 1852-1860.
- [101] Kortmann, U.; McAlpine, J.N.; Xue, H.; Guan, J.; Ha, G.; Tully, S.; Shafait, S.; Lau, A.; Cranston, A.N.; O'Connor, M.J.; Huntsman, D.G.; Wang, Y.; Gilks, C.B. Tumor growth inhibition by olaparib in BRCA2 germline-mutated patient-derived ovarian cancer tissue xenografts *Clin. Cancer Res.* 2011, 17, 783-791.
- [102] Takenaka, T.; Yoshino, I.; Kouso, H.; Ohba, T.; Yohena, T.; Osoegawa, A.; Shoji, F.; Maehara, Y. Combined evaluation of Rad51 and ERCC1 expressions for sensitivity to platinum agents in non-small cell lung cancer *Int. J. Cancer*. 2007, 121, 895-900.
- [103] Penning, T.D.; Zhu, G.D.; Gandhi, V.B.; Gong, J.; Liu, X.; Shi, Y.; Klinghofer, V.; Johnson, E.F.; Donawho, C.K.; Frost, D.J.; Bontcheva-Diaz, V.; Bouska, J.J.; Osterling, D.J.; Olson, A.M.; Marsh, K.C.; Luo, Y.; Giranda, V.L. Discovery of the Poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) inhibitor 2-[(R)-2-methylpyrrolidin-2-yl]-1H-benzimidazole-4-carboxamide (ABT-888) for the treatment of cancer *J. Med. Chem.* 2009, 52, 514-523.
- [104] Chang, I.Y.; Kim, M.H.; Kim, H.B.; Lee, D.Y.; Kim, S.H.; Kim, H.Y.; You, H.J. Small interfering RNA-induced suppression of ERCC1 enhances sensitivity of human cancer cells to cisplatin *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2005, 327, 225-233.
- [105] Shimizu, J.; Horio, Y.; Osada, H.; Hida, T.; Hasegawa, Y.; Shimokata, K.; Takahashi, T.; Sekido, Y.; Yatabe, Y. mRNA expression of RRM1, ERCC1 and ERCC2 is not associated with chemosensitivity to cisplatin, carboplatin and gemcitabine in human lung cancer cell lines *Respirology*. 2008, 13, 510-517.
- [106] Gallmeier, E.; Calhoun, E.S.; Rago, C.; Brody, J.R.; Cunningham, S.C.; Hucl, T.; Gorospe, M.; Kohli, M.; Lengauer, C.; Kern, S.E. Targeted disruption of FANCC and FANCG in human cancer provides a preclinical model for specific therapeutic options *Gastroenterology*. 2006, 130, 2145-2154.



- [107] Lu, Y.; Mani, S.; Kandimalla, E.R.; Yu, D.; Agrawal, S.; States, J.C.; Bregman, D.B. The Cockayne syndrome group B DNA repair protein as an anti-cancer target *Int. J. Oncol.* 2001, *19*, 1089-1097.
- [108] Perego, P.; Zunino, F.; Carenini, N.; Giuliani, F.; Spinelli, S.; Howell, S.B. Sensitivity to cisplatin and platinum-containing compounds of *Schizosaccharomyces pombe* rad mutants *Mol. Pharmacol.* 1998, *54*, 213-219.
- [109] Donawho, C.K.; Luo, Y.; Luo, Y.; Penning, T.D.; Bauch, J.L.; Bouska, J.J.; Bontcheva-Diaz, V.D.; Cox, B.F.; DeWeese, T.L.; Dillehay, L.E.; Ferguson, D.C.; Ghoreishi-Haack, N.S.; Grimm, D.R.; Guan, R.; Han, E.K.; Holley-Shanks, R.R.; Hristov, B.; Idler, K.B.; Jarvis, K.; Johnson, E.F.; Kleinberg, L.R.; Klinghofer, V.; Lasko, L.M.; Liu, X.; Marsh, K.C.; McGonigal, T.P.; Meulbroek, J.A.; Olson, A.M.; Palma, J.P.; Rodriguez, L.E.; Shi, Y.; Stavropoulos, J.A.; Tsurutani, A.C.; Zhu, G.D.; Rosenberg, S.H.; Giranda, V.L.; Frost, D.J. ABT-888, an orally active poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor that potentiates DNA-damaging agents in preclinical tumor models *Clin. Cancer Res.* 2007, *13*, 2728-2737.
- [110] Hoy, C.A.; Thompson, L.H.; Mooney, C.L.; Salazar, E.P. Defective DNA cross-link removal in Chinese hamster cell mutants hypersensitive to bifunctional alkylating agents *Cancer Res.* 1985, *45*, 1737-1743.
- [111] Andersson, B.S.; Sadeghi, T.; Siciliano, M.J.; Legerski, R.; Murray, D. Nucleotide excision repair genes as determinants of cellular sensitivity to cyclophosphamide analogs *Cancer Chemother. Pharmacol.* 1996, *38*, 406-416.
- [112] Murray, D.; Vallee-Lucic, L.; Rosenberg, E.; Andersson, B. Sensitivity of nucleotide excision repair-deficient human cells to ionizing radiation and cyclophosphamide *Anticancer Res.* 2002, *22*, 21-26.
- [113] Ishida, R.; Buchwald, M. Susceptibility of Fanconi's anemia lymphoblasts to DNA-cross-linking and alkylating agents *Cancer Res.* 1982, *42*, 4000-4006.
- [114] Yabe, M.; Yabe, H.; Hamanoue, S.; Inoue, H.; Matsumoto, M.; Koike, T.; Ishiguro, H.; Morimoto, T.; Arakawa, S.; Ohshima, T.; Masukawa, A.; Miyachi, H.; Yamashita, T.; Katob, S. In vitro effect of fludarabine, cyclophosphamide, and cytosine arabinoside on chromosome breakage in Fanconi anemia patients: relevance to stem cell transplantation *Int. J. Hematol.* 2007, *85*, 354-361.
- [115] Shiraishi, A.; Sakumi, K.; Sekiguchi, M. Increased susceptibility to chemotherapeutic alkylating agents of mice deficient in DNA repair methyltransferase *Carcinogenesis*. 2000, *21*, 1879-1883.
- [116] Evers, B.; Schut, E.; van der, B.E.; Braumuller, T.M.; Egan, D.A.; Holstege, H.; Edser, P.; Adams, D.J.; Wade-Martins, R.; Bouwman, P.; Jonkers, J. A high-throughput pharmaceutical screen identifies compounds with specific toxicity against BRCA2-deficient tumors *Clin. Cancer Res.* 2010, *16*, 99-108.
- [117] Bello, V.E.; Aloyz, R.S.; Christodoulopoulos, G.; Panasci, L.C. Homologous recombinational repair vis-a-vis chlorambucil resistance in chronic lymphocytic leukemia *Biochem. Pharmacol.* 2002, *63*, 1585-1588.

- [118] Aloyz, R.; Grzywacz, K.; Xu, Z.Y.; Loignon, M.; Alaoui-Jamali, M.A.; Panasci, L. Imatinib sensitizes CLL lymphocytes to chlorambucil *Leukemia*. 2004, *18*, 409-414.
- [119] Gu, Y.; Patterson, A.V.; Atwell, G.J.; Chernikova, S.B.; Brown, J.M.; Thompson, L.H.; Wilson, W.R. Roles of DNA repair and reductase activity in the cytotoxicity of the hypoxia-activated dinitrobenzamide mustard PR-104A *Mol. Cancer Ther.* 2009, *8*, 1714-1723.
- [120] Amrein, L.; Loignon, M.; Goulet, A.C.; Dunn, M.; Jean-Claude, B.; Aloyz, R.; Panasci, L. Chlorambucil cytotoxicity in malignant B lymphocytes is synergistically increased by 2-(morpholin-4-yl)-benzo[h]chomen-4-one (NU7026)-mediated inhibition of DNA double-strand break repair via inhibition of DNA-dependent protein kinase *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2007, *321*, 848-855.
- [121] Christodouloupoulos, G.; Muller, C.; Salles, B.; Kazmi, R.; Panasci, L. Potentiation of chlorambucil cytotoxicity in B-cell chronic lymphocytic leukemia by inhibition of DNA-dependent protein kinase activity using wortmannin *Cancer Res.* 1998, *58*, 1789-1792.
- [122] Belenkov, A.I.; Paiement, J.P.; Panasci, L.C.; Monia, B.P.; Chow, T.Y. An antisense oligonucleotide targeted to human Ku86 messenger RNA sensitizes M059K malignant glioma cells to ionizing radiation, bleomycin, and etoposide but not DNA cross-linking agents *Cancer Res.* 2002, *62*, 5888-5896.
- [123] Allan, J.M.; Engelward, B.P.; Dreslin, A.J.; Wyatt, M.D.; Tomasz, M.; Samson, L.D. Mammalian 3-methyladenine DNA glycosylase protects against the toxicity and clastogenicity of certain chemotherapeutic DNA cross-linking agents *Cancer Res.* 1998, *58*, 3965-3973.
- [124] Tebbs, R.S.; Hinz, J.M.; Yamada, N.A.; Wilson, J.B.; Salazar, E.P.; Thomas, C.B.; Jones, I.M.; Jones, N.J.; Thompson, L.H. New insights into the Fanconi anemia pathway from an isogenic FancG hamster CHO mutant *DNA Repair (Amst)*. 2005, *4*, 11-22.
- [125] McHugh, P.J.; Sones, W.R.; Hartley, J.A. Repair of intermediate structures produced at DNA interstrand cross-links in *Saccharomyces cerevisiae* *Mol. Cell Biol.* 2000, *20*, 3425-3433.
- [126] Barber, L.J.; Ward, T.A.; Hartley, J.A.; McHugh, P.J. DNA interstrand cross-link repair in the *Saccharomyces cerevisiae* cell cycle: overlapping roles for PSO2 (SNM1) with MutS factors and EXO1 during S phase *Mol. Cell Biol.* 2005, *25*, 2297-2309.
- [127] De Silva, I.U.; McHugh, P.J.; Clingen, P.H.; Hartley, J.A. Defining the roles of nucleotide excision repair and recombination in the repair of DNA interstrand cross-links in mammalian cells *Mol. Cell Biol.* 2000, *20*, 7980-7990.
- [128] Muller, C.; Calsou, P.; Salles, B. The activity of the DNA-dependent protein kinase (DNA-PK) complex is determinant in the cellular response to nitrogen mustards *Biochimie*. 2000, *82*, 25-28.

- [129] McHugh, P.J.; Gill, R.D.; Waters, R.; Hartley, J.A. Excision repair of nitrogen mustard-DNA adducts in *Saccharomyces cerevisiae* *Nucleic Acids Res.* 1999, 27, 3259-3266.
- [130] Kisby, G.E.; Olivas, A.; Park, T.; Churchwell, M.; Doerge, D.; Samson, L.D.; Gerson, S.L.; Turker, M.S. DNA repair modulates the vulnerability of the developing brain to alkylating agents *DNA Repair (Amst)*. 2009, 8, 400-412.
- [131] Weltin, D.; Marchal, J.; Dufour, P.; Potworowski, E.; Oth, D.; Bischoff, P. Effect of 6(5H)-phenanthridinone, an inhibitor of poly(ADP-ribose) polymerase, on cultured tumor cells *Oncol. Res.* 1994, 6, 399-403.
- [132] Marathi, U.K.; Howell, S.R.; Ashmun, R.A.; Brent, T.P. The Fanconi anemia complementation group C protein corrects DNA interstrand cross-link-specific apoptosis in HSC536N cells *Blood*. 1996, 88, 2298-2305.
- [133] Yamamoto, K.N.; Hirota, K.; Kono, K.; Takeda, S.; Sakamuru, S.; Xia, M.; Huang, R.; Austin, C.P.; Witt, K.L.; Tice, R.R. Characterization of environmental chemicals with potential for DNA damage using isogenic DNA repair-deficient chicken DT40 cell lines *Environ. Mol. Mutagen.* 2011, 52, 547-561.
- [134] Clingen, P.H.; De Silva, I.U.; McHugh, P.J.; Ghadessy, F.J.; Tilby, M.J.; Thurston, D.E.; Hartley, J.A. The XPF-ERCC1 endonuclease and homologous recombination contribute to the repair of minor groove DNA interstrand crosslinks in mammalian cells produced by the pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepine dimer SJG-136 *Nucleic Acids Res.* 2005, 33, 3283-3291.
- [135] McNeill, D.R.; Lam, W.; DeWeese, T.L.; Cheng, Y.C.; Wilson, D.M., III Impairment of APE1 function enhances cellular sensitivity to clinically relevant alkylators and antimetabolites *Mol. Cancer Res.* 2009, 7, 897-906.
- [136] Chatterjee, S.; Cheng, M.F.; Berger, N.A. Hypersensitivity to clinically useful alkylating agents and radiation in poly(ADP-ribose) polymerase-deficient cell lines *Cancer Commun.* 1990, 2, 401-407.
- [137] Damia, G.; Imperatori, L.; Stefanini, M.; D'Incalci, M. Sensitivity of CHO mutant cell lines with specific defects in nucleotide excision repair to different anti-cancer agents *Int. J. Cancer.* 1996, 66, 779-783.
- [138] Marchini, S.; Damia, G.; Broggin, M.; Pennella, G.; Ripamonti, M.; Marsiglio, A.; Geroni, C. 4-Demethoxy-3'-deamino-3'-aziridinyl-4'-methylsulphonyl-daunorubicin (PNU-159548), a novel anticancer agent active against tumor cell lines with different resistance mechanisms *Cancer Res.* 2001, 61, 1991-1995.
- [139] Fiumicino, S.; Martinelli, S.; Colussi, C.; Aquilina, G.; Leonetti, C.; Crescenzi, M.; Bignami, M. Sensitivity to DNA cross-linking chemotherapeutic agents in mismatch repair-defective cells in vitro and in xenografts *Int. J. Cancer.* 2000, 85, 590-596.
- [140] Chen, Q.; Van der Sluis, P.C.; Boulware, D.; Hazlehurst, L.A.; Dalton, W.S. The FA/BRCA pathway is involved in melphalan-induced DNA interstrand cross-link

- repair and accounts for melphalan resistance in multiple myeloma cells *Blood*. 2005, *106*, 698-705.
- [141] Aquilina, G.; Ceccotti, S.; Martinelli, S.; Hampson, R.; Bignami, M. N-(2-chloroethyl)-N'-cyclohexyl-N-nitrosourea sensitivity in mismatch repair-defective human cells *Cancer Res.* 1998, *58*, 135-141.
  - [142] Aquilina, G.; Crescenzi, M.; Bignami, M. Mismatch repair, G(2)/M cell cycle arrest and lethality after DNA damage *Carcinogenesis*. 1999, *20*, 2317-2326.
  - [143] Ferguson, L.R. Mutagenic and recombinogenic consequences of DNA-repair inhibition during treatment with 1,3-bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea in *Saccharomyces cerevisiae* *Mutat. Res.* 1990, *241*, 369-377.
  - [144] Engelward, B.P.; Dreslin, A.; Christensen, J.; Huszar, D.; Kurahara, C.; Samson, L. Repair-deficient 3-methyladenine DNA glycosylase homozygous mutant mouse cells have increased sensitivity to alkylation-induced chromosome damage and cell killing *EMBO J.* 1996, *15*, 945-952.
  - [145] Elder, R.H.; Jansen, J.G.; Weeks, R.J.; Willington, M.A.; Deans, B.; Watson, A.J.; Mynett, K.J.; Bailey, J.A.; Cooper, D.P.; Rafferty, J.A.; Heeran, M.C.; Wijnhoven, S.W.; van Zeeland, A.A.; Margison, G.P. Alkylpurine-DNA-N-glycosylase knockout mice show increased susceptibility to induction of mutations by methyl methanesulfonate *Mol. Cell Biol.* 1998, *18*, 5828-5837.
  - [146] Kelner, M.J.; McMorris, T.C.; Estes, L.; Rutherford, M.; Montoya, M.; Goldstein, J.; Samson, K.; Starr, R.; Taetle, R. Characterization of illudin S sensitivity in DNA repair-deficient Chinese hamster cells. Unusually high sensitivity of ERCC2 and ERCC3 DNA helicase-deficient mutants in comparison to other chemotherapeutic agents *Biochem. Pharmacol.* 1994, *48*, 403-409.
  - [147] Liu, L.; Markowitz, S.; Gerson, S.L. Mismatch repair mutations override alkyltransferase in conferring resistance to temozolomide but not to 1,3-bis(2-chloroethyl)nitrosourea *Cancer Res.* 1996, *56*, 5375-5379.
  - [148] Hickman, M.J.; Samson, L.D. Role of DNA mismatch repair and p53 in signaling induction of apoptosis by alkylating agents *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1999, *96*, 10764-10769.
  - [149] Smith, D.G.; Brent, T.P. Response of cultured human cell lines from rhabdomyosarcoma xenografts to treatment with chloroethylnitrosoureas *Cancer Res.* 1989, *49*, 883-886.
  - [150] Glassner, B.J.; Weeda, G.; Allan, J.M.; Broekhof, J.L.; Carls, N.H.; Donker, I.; Engelward, B.P.; Hampson, R.J.; Hersmus, R.; Hickman, M.J.; Roth, R.B.; Warren, H.B.; Wu, M.M.; Hoeijmakers, J.H.; Samson, L.D. DNA repair methyltransferase (Mgmt) knockout mice are sensitive to the lethal effects of chemotherapeutic alkylating agents *Mutagenesis*. 1999, *14*, 339-347.
  - [151] Lage, H.; Christmann, M.; Kern, M.A.; Dietel, M.; Pick, M.; Kaina, B.; Schandendorf, D. Expression of DNA repair proteins hMSH2, hMSH6, hMLH1,

- O6-methylguanine-DNA methyltransferase and N-methylpurine-DNA glycosylase in melanoma cells with acquired drug resistance *Int. J. Cancer*. 1999, 80, 744-750.
- [152] Runger, T.M.; Emmert, S.; Schadendorf, D.; Diem, C.; Epe, B.; Hellfritsch, D. Alterations of DNA repair in melanoma cell lines resistant to cisplatin, fotemustine, or etoposide *J. Invest Dermatol*. 2000, 114, 34-39.
  - [153] Passagne, I.; Evrard, A.; Winum, J.Y.; Depeille, P.; Cuq, P.; Montero, J.L.; Cupissol, D.; Vian, L. Cytotoxicity, DNA damage, and apoptosis induced by new fotemustine analogs on human melanoma cells in relation to O6-methylguanine DNA-methyltransferase expression *J. Pharmacol. Exp. Ther*. 2003, 307, 816-823.
  - [154] Roos, W.P.; Tsaalbi-Shtylik, A.; Tsaryk, R.; Guvercin, F.; de Wind, N.; Kaina, B. The translesion polymerase Rev3L in the tolerance of alkylating anticancer drugs *Mol. Pharmacol*. 2009, 76, 927-934.
  - [155] Quiros, S.; Roos, W.P.; Kaina, B. Rad51 and BRCA2--New molecular targets for sensitizing glioma cells to alkylating anticancer drugs *PLoS. One*. 2011, 6, e27183.
  - [156] Kondo, N.; Takahashi, A.; Mori, E.; Noda, T.; Su, X.; Ohnishi, K.; McKinnon, P.J.; Sakaki, T.; Nakase, H.; Ono, K.; Ohnishi, T. DNA ligase IV is a potential molecular target in ACNU sensitivity *Cancer Sci*. 2010, 101, 1881-1885.
  - [157] Ono, Y.; Matsumoto, K.; Furuta, T.; Ohmoto, T.; Akiyama, K.; Seki, S. Relationship between expression of a major apurinic/apyrimidinic endonuclease (APEX nuclease) and susceptibility to genotoxic agents in human glioma cell lines *J. Neurooncol*. 1995, 25, 183-192.
  - [158] Nikolova, T.; Christmann, M.; Kaina, B. FEN1 is overexpressed in testis, lung and brain tumors *Anticancer Res*. 2009, 29, 2453-2459.
  - [159] Kondo, N.; Takahashi, A.; Mori, E.; Noda, T.; Zdzienicka, M.Z.; Thompson, L.H.; Helleday, T.; Suzuki, M.; Kinashi, Y.; Masunaga, S.; Ono, K.; Hasegawa, M.; Ohnishi, T. FANCD1/BRCA2 plays predominant role in the repair of DNA damage induced by ACNU or TMZ *PLoS. One*. 2011, 6, e19659.
  - [160] Sato, K.; Kitajima, Y.; Koga, Y.; Miyazaki, K. The effect of o6-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) and mismatch repair gene (hMLH1) status on the sensitivity to alkylating agent 1-(4-amino-2-methyl-5-pyrimidinyl)methyl-3-(2-chloroethyl)-3-nitrosourea(ACNU) in gallbladder carcinoma cells *Anticancer Res*. 2005, 25, 4021-4028.
  - [161] Cardinal, J.W.; Margison, G.P.; Mynett, K.J.; Yates, A.P.; Cameron, D.P.; Elder, R.H. Increased susceptibility to streptozotocin-induced beta-cell apoptosis and delayed autoimmune diabetes in alkylpurine-DNA-N-glycosylase-deficient mice *Mol. Cell Biol*. 2001, 21, 5605-5613.
  - [162] Masutani, M.; Suzuki, H.; Kamada, N.; Watanabe, M.; Ueda, O.; Nozaki, T.; Jishage, K.; Watanabe, T.; Sugimoto, T.; Nakagama, H.; Ochiya, T.; Sugimura, T. Poly(ADP-ribose) polymerase gene disruption conferred mice resistant to streptozotocin-induced diabetes *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*. 1999, 96, 2301-2304.



- [163] Friedman, H.S.; Johnson, S.P.; Dong, Q.; Schold, S.C.; Rasheed, B.K.; Bigner, S.H.; Ali-Osman, F.; Dolan, E.; Colvin, O.M.; Houghton, P.; Germain, G.; Drummond, J.T.; Keir, S.; Marcelli, S.; Bigner, D.D.; Modrich, P. Methylator resistance mediated by mismatch repair deficiency in a glioblastoma multiforme xenograft *Cancer Res.* 1997, *57*, 2933-2936.
- [164] Kobune, M.; Xu, Y.; Baum, C.; Kelley, M.R.; Williams, D.A. Retrovirus-mediated expression of the base excision repair proteins, formamidopyrimidine DNA glycosylase or human oxoguanine DNA glycosylase, protects hematopoietic cells from N,N',N''-triethylenethiophosphoramidate (thioTEPA)-induced toxicity in vitro and in vivo *Cancer Res.* 2001, *61*, 5116-5125.
- [165] Cohen, N.A.; Egorin, M.J.; Snyder, S.W.; Ashar, B.; Wietharn, B.E.; Pan, S.S.; Ross, D.D.; Hilton, J. Interaction of N,N',N''-triethylenethiophosphoramidate and N,N',N''-triethylenephosphoramidate with cellular DNA *Cancer Res.* 1991, *51*, 4360-4366.
- [166] McManus, F.P.; Fang, Q.; Booth, J.D.; Noronha, A.M.; Pegg, A.E.; Wilds, C.J. Synthesis and characterization of an O(6)-2'-deoxyguanosine-alkyl-O(6)-2'-deoxyguanosine interstrand cross-link in a 5'-GNC motif and repair by human O(6)-alkylguanine-DNA alkyltransferase *Org. Biomol. Chem.* 2010, *8*, 4414-4426.
- [167] Kiyohara, E.; Tamai, K.; Katayama, I.; Kaneda, Y. The combination of chemotherapy with HVJ-E containing Rad51 siRNA elicited diverse anti-tumor effects and synergistically suppressed melanoma *Gene Ther.* 2011 *10*.
- [168] Yang, S.; Irani, K.; Heffron, S.E.; Jurnak, F.; Meyskens, F.L., Jr. Alterations in the expression of the apurinic/apyrimidinic endonuclease-1/redox factor-1 (APE/Ref-1) in human melanoma and identification of the therapeutic potential of resveratrol as an APE/Ref-1 inhibitor *Mol. Cancer Ther.* 2005, *4*, 1923-1935.
- [169] Khan, O.A.; Gore, M.; Lorigan, P.; Stone, J.; Greystoke, A.; Burke, W.; Carmichael, J.; Watson, A.J.; McGown, G.; Thorncroft, M.; Margison, G.P.; Califano, R.; Larkin, J.; Wellman, S.; Middleton, M.R. A phase I study of the safety and tolerability of olaparib (AZD2281, KU0059436) and dacarbazine in patients with advanced solid tumours *Br. J. Cancer.* 2011, *104*, 750-755.
- [170] Sanada, M.; Takagi, Y.; Ito, R.; Sekiguchi, M. Killing and mutagenic actions of dacarbazine, a chemotherapeutic alkylating agent, on human and mouse cells: effects of Mgmt and Mlh1 mutations *DNA Repair (Amst).* 2004, *3*, 413-420.
- [171] Schold, S.C., Jr.; Brent, T.P.; von Hofe, E.; Friedman, H.S.; Mitra, S.; Bigner, D.D.; Swenberg, J.A.; Kleihues, P. O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase and sensitivity to procarbazine in human brain-tumor xenografts *J. Neurosurg.* 1989, *70*, 573-577.
- [172] Roos, W.P.; Nikolova, T.; Quiros, S.; Naumann, S.C.; Kiedron, O.; Zdzienicka, M.Z.; Kaina, B. Brca2/Xrcc2 dependent HR, but not NHEJ, is required for protection against O(6)-methylguanine triggered apoptosis, DSBs and chromosomal aberrations by a process leading to SCEs *DNA Repair (Amst).* 2009, *8*, 72-86.

- [173] Stachelek, G.C.; Dalal, S.; Donigan, K.A.; Campisi, H.D.; Sweasy, J.B.; Glazer, P.M. Potentiation of temozolomide cytotoxicity by inhibition of DNA polymerase beta is accentuated by BRCA2 mutation *Cancer Res.* 2010, 70, 409-417.
- [174] Mirzoeva, O.K.; Kawaguchi, T.; Pieper, R.O. The Mre11/Rad50/Nbs1 complex interacts with the mismatch repair system and contributes to temozolomide-induced G2 arrest and cytotoxicity *Mol. Cancer Ther.* 2006, 5, 2757-2766.
- [175] Short, S.C.; Giampieri, S.; Worku, M.; Alcaide-German, M.; Sioftanos, G.; Bourne, S.; Lio, K.I.; Shaked-Rabi, M.; Martindale, C. Rad51 inhibition is an effective means of targeting DNA repair in glioma models and CD133+ tumor-derived cells *Neuro. Oncol.* 2011, 13, 487-499.
- [176] Kondo, N.; Takahashi, A.; Mori, E.; Ohnishi, K.; McKinnon, P.J.; Sakaki, T.; Nakase, H.; Ohnishi, T. DNA ligase IV as a new molecular target for temozolomide *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2009, 387, 656-660.
- [177] Trivedi, R.N.; Almeida, K.H.; Fornisaglio, J.L.; Schamus, S.; Sobol, R.W. The role of base excision repair in the sensitivity and resistance to temozolomide-mediated cell death *Cancer Res.* 2005, 65, 6394-6400.
- [178] Du, L.Q.; Du, X.Q.; Bai, J.Q.; Wang, Y.; Yang, Q.S.; Wang, X.C.; Zhao, P.; Wang, H.; Liu, Q.; Fan, F.Y. Methotrexate-mediated inhibition of RAD51 expression and homologous recombination in cancer cells *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 2012, 138, 811-818.
- [179] Ohta, S.; Shimada, M.; Matsukawa, S.; Taga, T.; Yamazaki, S. Flowcytometric analysis of DNA pattern of cells derived from xeroderma pigmentosum A--hypersensitivity to vincristine, etoposide and methotrexate *Acta Paediatr. Jpn.* 1990, 32, 262-268.
- [180] Frouin, I.; Prosperi, E.; Denegri, M.; Negri, C.; Donzelli, M.; Rossi, L.; Riva, F.; Stefanini, M.; Scovassi, A.I. Different effects of methotrexate on DNA mismatch repair proficient and deficient cells *Eur. J. Cancer.* 2001, 37, 1173-1180.
- [181] Martin, S.A.; McCarthy, A.; Barber, L.J.; Burgess, D.J.; Parry, S.; Lord, C.J.; Ashworth, A. Methotrexate induces oxidative DNA damage and is selectively lethal to tumour cells with defects in the DNA mismatch repair gene MSH2 *EMBO Mol. Med.* 2009, 1, 323-337.
- [182] Maynard, K.; Parsons, P.G. Cross-sensitivity of methylating agents, hydroxyurea, and methotrexate in human tumor cells of the Mer- phenotype *Cancer Res.* 1986, 46, 5009-5013.
- [183] Yang, Z.; Waldman, A.S.; Wyatt, M.D. DNA damage and homologous recombination signaling induced by thymidylate deprivation *Biochem. Pharmacol.* 2008, 76, 987-996.
- [184] Li, L.; Connor, E.E.; Berger, S.H.; Wyatt, M.D. Determination of apoptosis, uracil incorporation, DNA strand breaks, and sister chromatid exchanges under conditions of thymidylate deprivation in a model of BER deficiency *Biochem. Pharmacol.* 2005, 70, 1458-1468.

- [185] Li, L.; Berger, S.H.; Wyatt, M.D. Involvement of base excision repair in response to therapy targeted at thymidylate synthase *Mol. Cancer Ther.* 2004, 3, 747-753.
- [186] Luo, Y.; Walla, M.; Wyatt, M.D. Uracil incorporation into genomic DNA does not predict toxicity caused by chemotherapeutic inhibition of thymidylate synthase *DNA Repair (Amst)*. 2008, 7, 162-169.
- [187] Welsh, S.J.; Hobbs, S.; Aherne, G.W. Expression of uracil DNA glycosylase (UDG) does not affect cellular sensitivity to thymidylate synthase (TS) inhibition *Eur. J. Cancer*. 2003, 39, 378-387.
- [188] Meyers, M.; Wagner, M.W.; Mazurek, A.; Schmutte, C.; Fishel, R.; Boothman, D.A. DNA mismatch repair-dependent response to fluoropyrimidine-generated damage *J. Biol. Chem.* 2005, 280, 5516-5526.
- [189] Bulgar, A.D.; Weeks, L.D.; Miao, Y.; Yang, S.; Xu, Y.; Guo, C.; Markowitz, S.; Oleinick, N.; Gerson, S.L.; Liu, L. Removal of uracil by uracil DNA glycosylase limits pemetrexed cytotoxicity: overriding the limit with methoxyamine to inhibit base excision repair *Cell Death. Dis.* 2012, 3:e252. doi: 10.1038/cddis.2011.135., e252.
- [190] Vergote, I.; Calvert, H.; Kania, M.; Kaiser, C.; Zimmermann, A.H.; Sehouli, J. A randomised, double-blind, phase II study of two doses of pemetrexed in the treatment of platinum-resistant, epithelial ovarian or primary peritoneal cancer *Eur. J. Cancer*. 2009, 45, 1415-1423.
- [191] Seiple, L.; Jaruga, P.; Dizdaroglu, M.; Stivers, J.T. Linking uracil base excision repair and 5-fluorouracil toxicity in yeast *Nucleic Acids Res.* 2006, 34, 140-151.
- [192] Matuo, R.; Sousa, F.G.; Escargueil, A.E.; Soares, D.G.; Grivicich, I.; Saffi, J.; Larsen, A.K.; Henriques, J.A. DNA repair pathways involved in repair of lesions induced by 5-fluorouracil and its active metabolite FdUMP *Biochem. Pharmacol.* 2010, 79, 147-153.
- [193] El Awady, R.A.; Saleh, E.M.; Dahm-Daphi, J. Targeting DNA double-strand break repair: is it the right way for sensitizing cells to 5-fluorouracil? *Anticancer Drugs*. 2010, 21, 277-287.
- [194] Geng, L.; Huehls, A.M.; Wagner, J.M.; Huntoon, C.J.; Karnitz, L.M. Checkpoint signaling, base excision repair, and PARP promote survival of colon cancer cells treated with 5-fluorodeoxyuridine but not 5-fluorouracil *PLoS. One*. 2011, 6, e28862.
- [195] Huehls, A.M.; Wagner, J.M.; Huntoon, C.J.; Geng, L.; Erlichman, C.; Patel, A.G.; Kaufmann, S.H.; Karnitz, L.M. Poly(ADP-Ribose) polymerase inhibition synergizes with 5-fluorodeoxyuridine but not 5-fluorouracil in ovarian cancer cells *Cancer Res.* 2011, 71, 4944-4954.
- [196] Andersen, S.; Heine, T.; Sneve, R.; Konig, I.; Krokan, H.E.; Epe, B.; Nilsen, H. Incorporation of dUMP into DNA is a major source of spontaneous DNA damage, while excision of uracil is not required for cytotoxicity of fluoropyrimidines in mouse embryonic fibroblasts *Carcinogenesis*. 2005, 26, 547-555.



- [197] Carethers, J.M.; Chauhan, D.P.; Fink, D.; Nebel, S.; Bresalier, R.S.; Howell, S.B.; Boland, C.R. Mismatch repair proficiency and in vitro response to 5-fluorouracil *Gastroenterology*. 1999, *117*, 123-131.
- [198] Meyers, M.; Wagner, M.W.; Hwang, H.S.; Kinsella, T.J.; Boothman, D.A. Role of the hMLH1 DNA mismatch repair protein in fluoropyrimidine-mediated cell death and cell cycle responses *Cancer Res.* 2001, *61*, 5193-5201.
- [199] Fujita, H.; Kato, J.; Horii, J.; Harada, K.; Hiraoka, S.; Shiraha, H.; Sakaguchi, K.; Shiratori, Y. Decreased expression of hMLH1 correlates with reduced 5-fluorouracil-mediated apoptosis in colon cancer cells *Oncol. Rep.* 2007, *18*, 1129-1137.
- [200] Murakami, J.; Lee, Y.J.; Koikeguchi, S.; Tsujigiwa, H.; Asaumi, J.; Nagatsuka, H.; Fukui, K.; Kuroda, M.; Tanaka, N.; Matsubara, N. Depletion of O6-methylguanine-DNA methyltransferase by O6-benzylguanine enhances 5-FU cytotoxicity in colon and oral cancer cell lines *Oncol. Rep.* 2007, *17*, 1461-1467.
- [201] Terashima, I.; Kohda, K. Cytotoxicity of fluoroethylating agents is potentiated by O6-benzylguanine *Biol. Pharm. Bull.* 1996, *19*, 956-961.
- [202] van Waardenburg, R.C.; de Jong, L.A.; van Delft, F.; van Eijndhoven, M.A.; Bohlander, M.; Bjornsti, M.A.; Brouwer, J.; Schellens, J.H. Homologous recombination is a highly conserved determinant of the synergistic cytotoxicity between cisplatin and DNA topoisomerase I poisons *Mol. Cancer Ther.* 2004, *3*, 393-402.
- [203] Poot, M.; Jin, X.; Hill, J.P.; Gollahan, K.A.; Rabinovitch, P.S. Distinct functions for WRN and TP53 in a shared pathway of cellular response to 1-beta-D-arabinofuranosylcytosine and bleomycin *Exp. Cell Res.* 2004, *296*, 327-336.
- [204] Moses, K.; Harris, A.L.; Durkacz, B.W. Adenosine-diphosphoribosyltransferase inhibitors can protect against or potentiate the cytotoxicity of S-phase acting drugs *Biochem. Pharmacol.* 1988, *37*, 2155-2160.
- [205] Garcia-Diaz, M.; Murray, M.S.; Kunkel, T.A.; Chou, K.M. Interaction between DNA Polymerase lambda and anticancer nucleoside analogs *J. Biol. Chem.* 2010, *285*, 16874-16879.
- [206] Wang, Y.; Liu, X.; Matsuda, A.; Plunkett, W. Repair of 2'-C-cyano-2'-deoxy-1-beta-D-arabino-pentofuranosylcytosine-induced DNA single-strand breaks by transcription-coupled nucleotide excision repair *Cancer Res.* 2008, *68*, 3881-3889.
- [207] Takahashi, T.; Min, Z.; Uchida, I.; Arita, M.; Watanabe, Y.; Koi, M.; Hemmi, H. Hypersensitivity in DNA mismatch repair-deficient colon carcinoma cells to DNA polymerase reaction inhibitors *Cancer Lett.* 2005, *220*, 85-93.
- [208] Nakano, T.; Katafuchi, A.; Matsubara, M.; Terato, H.; Tsuboi, T.; Masuda, T.; Tatsumoto, T.; Pack, S.P.; Makino, K.; Croteau, D.L.; Van Houten, B.; Iijima, K.; Tauchi, H.; Ide, H. Homologous recombination but not nucleotide excision repair plays a pivotal role in tolerance of DNA-protein cross-links in mammalian cells *J. Biol. Chem.* 2009, *284*, 27065-27076.

- [209] Gaymes, T.J.; Shall, S.; MacPherson, L.J.; Twine, N.A.; Lea, N.C.; Farzaneh, F.; Mufti, G.J. Inhibitors of poly ADP-ribose polymerase (PARP) induce apoptosis of myeloid leukemic cells: potential for therapy of myeloid leukemia and myelodysplastic syndromes *Haematologica*. 2009, *94*, 638-646.
- [210] Arnold, C.N.; Goel, A.; Boland, C.R. Role of hMLH1 promoter hypermethylation in drug resistance to 5-fluorouracil in colorectal cancer cell lines *Int. J. Cancer*. 2003, *106*, 66-73.
- [211] Wang, Z.; Li, M.; Lu, S.; Zhang, Y.; Wang, H. Promoter hypermethylation of FANCF plays an important role in the occurrence of ovarian cancer through disrupting Fanconi anemia-BRCA pathway *Cancer Biol. Ther.* 2006, *5*, 256-260.
- [212] Koutsimpelas, D.; Pongsapich, W.; Heinrich, U.; Mann, S.; Mann, W.J.; Brieger, J. Promoter methylation of MGMT, MLH1 and RASSF1A tumor suppressor genes in head and neck squamous cell carcinoma: pharmacological genome demethylation reduces proliferation of head and neck squamous carcinoma cells *Oncol. Rep.* 2012, *27*, 1135-1141.
- [213] Ewald, B.; Sampath, D.; Plunkett, W. ATM and the Mre11-Rad50-Nbs1 complex respond to nucleoside analogue-induced stalled replication forks and contribute to drug resistance *Cancer Res.* 2008, *68*, 7947-7955.
- [214] Tsai, M.S.; Kuo, Y.H.; Chiu, Y.F.; Su, Y.C.; Lin, Y.W. Down-regulation of Rad51 expression overcomes drug resistance to gemcitabine in human non-small-cell lung cancer cells *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2010, *335*, 830-840.
- [215] Wachters, F.M.; van Putten, J.W.; Maring, J.G.; Zdzienicka, M.Z.; Groen, H.J.; Kampinga, H.H. Selective targeting of homologous DNA recombination repair by gemcitabine *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 2003, *57*, 553-562.
- [216] van Putten, J.W.G.; Groen, H.J.M.; Smid, K.; Peters, G.J.; Kampinga, H.H. End-joining deficiency and radiosensitization induced by gemcitabine *Cancer Res.* 2001, *61*, 1585-1591.
- [217] Jacob, D.A.; Bahra, M.; Langrehr, J.M.; Boas-Knoop, S.; Stefaniak, R.; Davis, J.; Schumacher, G.; Lippert, S.; Neumann, U.P. Combination therapy of poly (ADP-ribose) polymerase inhibitor 3-aminobenzamide and gemcitabine shows strong antitumor activity in pancreatic cancer cells *J. Gastroenterol. Hepatol.* 2007, *22*, 738-748.
- [218] Bowman, K.J.; White, A.; Golding, B.T.; Griffin, R.J.; Curtin, N.J. Potentiation of anti-cancer agent cytotoxicity by the potent poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors NU1025 and NU1064 *Br. J. Cancer*. 1998, *78*, 1269-1277.
- [219] Robinson, B.W.; Im, M.M.; Ljungman, M.; Praz, F.; Shewach, D.S. Enhanced radiosensitization with gemcitabine in mismatch repair-deficient HCT116 cells *Cancer Res.* 2003, *63*, 6935-6941.
- [220] Konduri, S.D.; Ticku, J.; Bobustuc, G.C.; Sutphin, R.M.; Colon, J.; Isley, B.; Bhakat, K.K.; Srivenugopal, K.S.; Baker, C.H. Blockade of MGMT expression by

O6 benzyl guanine leads to inhibition of pancreatic cancer growth and induction of apoptosis *Clin. Cancer Res.* 2009, *15*, 6087-6095.

- [221] Ma, J.; Murphy, M.; O'Dwyer, P.J.; Berman, E.; Reed, K.; Gallo, J.M. Biochemical changes associated with a multidrug-resistant phenotype of a human glioma cell line with temozolomide-acquired resistance *Biochem. Pharmacol.* 2002, *63*, 1219-1228.
- [222] Moses, K.; Willmore, E.; Harris, A.L.; Durkacz, B.W. Correlation of enhanced 6-mercaptopurine cytotoxicity with increased phosphoribosylpyrophosphate levels in Chinese hamster ovary cells treated with 3-aminobenzamide *Cancer Res.* 1990, *50*, 1992-1996.
- [223] Krynetskaia, N.F.; Brenner, T.L.; Krynetski, E.Y.; Du, W.; Panetta, J.C.; Ching-Hon, P.; Evans, W.E. Msh2 deficiency attenuates but does not abolish thiopurine hematopoietic toxicity in msh2<sup>-/-</sup> mice *Mol. Pharmacol.* 2003, *64*, 456-465.
- [224] Frazelle, J.H.; Harris, J.S.; Swift, M. Responses of Fanconi anemia fibroblasts to adenine and purine analogues *Mutat. Res.* 1981, *80*, 373-380.
- [225] Issaeva, N.; Thomas, H.D.; Djureinovic, T.; Jaspers, J.E.; Stoimenov, I.; Kyle, S.; Pedley, N.; Gottipati, P.; Zur, R.; Sleeth, K.; Chatzakos, V.; Mulligan, E.A.; Lundin, C.; Gubanov, E.; Kersbergen, A.; Harris, A.L.; Sharma, R.A.; Rottenberg, S.; Curtin, N.J.; Helleday, T. 6-thioguanine selectively kills BRCA2-defective tumors and overcomes PARP inhibitor resistance *Cancer Res.* 2010, *70*, 6268-6276.
- [226] Rajesh, P.; Litvinchuk, A.V.; Pittman, D.L.; Wyatt, M.D. The Homologous Recombination Protein RAD51D Mediates the Processing of 6-Thioguanine Lesions Downstream of Mismatch Repair *Mol. Cancer Res.* 2011.
- [227] Lebel, M.; Leder, P. A deletion within the murine Werner syndrome helicase induces sensitivity to inhibitors of topoisomerase and loss of cellular proliferative capacity *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1998, *95*, 13097-13102.
- [228] Bergoglio, V.; Canitrot, Y.; Hogarth, L.; Minto, L.; Howell, S.B.; Cazaux, C.; Hoffmann, J.S. Enhanced expression and activity of DNA polymerase beta in human ovarian tumor cells: impact on sensitivity towards antitumor agents *Oncogene.* 2001, *20*, 6181-6187.
- [229] Brem, R.; Li, F.; Karran, P. Reactive oxygen species generated by thiopurine/UVA cause irreparable transcription-blocking DNA lesions *Nucleic Acids Res.* 2009, *37*, 1951-1961.
- [230] Ichikawa, M.; Nakane, H.; Marra, G.; Corti, C.; Jiricny, J.; Fitch, M.; Ford, J.M.; Ikejima, M.; Shimada, T.; Yoshino, M.; Takeuchi, S.; Nakatsu, Y.; Tanaka, K. Decreased UV sensitivity, mismatch repair activity and abnormal cell cycle checkpoints in skin cancer cell lines derived from UVB-irradiated XPA-deficient mice *Mutat. Res.* 2000, *459*, 285-298.

- [231] Abuin, A.; Zhang, H.; Bradley, A. Genetic analysis of mouse embryonic stem cells bearing Msh3 and Msh2 single and compound mutations *Mol. Cell Biol.* 2000, 20, 149-157.
- [232] Gefen, N.; Brkic, G.; Galron, D.; Priel, E.; Ozer, J.; Benharroch, D.; Gopas, J. Acquired resistance to 6-thioguanine in melanoma cells involves the repair enzyme O6-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) *Cancer Biol. Ther.* 2010, 9, 49-55.
- [233] Lawrenzi, J.; Bunnell, A.; Hentosh, P. Nucleotide excision repair-deficient human cells in culture exhibit decreased survival after 2-chlorodeoxyadenosine treatment *Anticancer Res.* 2003, 23, 3141-3145.
- [234] Wang, X.W.; Tseng, A.; Ellis, N.A.; Spillare, E.A.; Linke, S.P.; Robles, A.I.; Seker, H.; Yang, Q.; Hu, P.; Beresten, S.; Bemmels, N.A.; Garfield, S.; Harris, C.C. Functional interaction of p53 and BLM DNA helicase in apoptosis *J. Biol. Chem.* 2001, 276, 32948-32955.
- [235] Spencer, D.M.; Bilardi, R.A.; Koch, T.H.; Post, G.C.; Nafie, J.W.; Kimura, K.; Cutts, S.M.; Phillips, D.R. DNA repair in response to anthracycline-DNA adducts: a role for both homologous recombination and nucleotide excision repair *Mutat. Res.* 2008, 638, 110-121.
- [236] Singh, K.K.; Shukla, P.C.; Quan, A.; Desjardins, J.F.; Lovren, F.; Pan, Y.; Garg, V.; Gosal, S.; Garg, A.; Szmitko, P.E.; Schneider, M.D.; Parker, T.G.; Stanford, W.L.; Leong-Poi, H.; Teoh, H.; Al Omran, M.; Verma, S. BRCA2 protein deficiency exaggerates doxorubicin-induced cardiomyocyte apoptosis and cardiac failure *J. Biol. Chem.* 2012, 287, 6604-6614.
- [237] Abe, H.; Wada, M.; Kohno, K.; Kuwano, M. Altered drug sensitivities to anticancer agents in radiation-sensitive DNA repair deficient yeast mutants *Anticancer Res.* 1994, 14, 1807-1810.
- [238] Kim, S.H.; Kim, D.; Han, J.S.; Jeong, C.S.; Chung, B.S.; Kang, C.D.; Li, G.C. Ku autoantigen affects the susceptibility to anticancer drugs *Cancer Res.* 1999, 59, 4012-4017.
- [239] Zhang, Z.Z.; Zhang, Q.; Wu, M. Constructing the eukaryotic expression vector to study preliminarily the functions of hammerhead ribozyme targeting base excision repair gene HOGG1 *Sichuan. Da. Xue. Xue. Bao. Yi. Xue. Ban.* 2006, 37, 165-170.
- [240] Liu, S.; Wu, M.; Zhang, Z. Involvement of DNA polymerase beta in repairing oxidative damages induced by antitumor drug adriamycin *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2010.
- [241] Carvalho, H.; Garrido, L.M.; Furlan, R.L.; Padilla, G.; Agnoletto, M.; Guecheva, T.; Henriques, J.A.; Saffi, J.; Menck, C.F. DNA damage induced by the anthracycline cosmomycin D in DNA repair-deficient cells *Cancer Chemother. Pharmacol.* 2010, 65, 989-994.
- [242] Moraes, M.C.; de Andrade, A.Q.; Carvalho, H.; Guecheva, T.; Agnoletto, M.H.; Henriques, J.A.; Sarasin, A.; Sary, A.; Saffi, J.; Menck, C.F. Both XPA and DNA

- polymerase eta are necessary for the repair of doxorubicin-induced DNA lesions *Cancer Lett.* 2012, *314*, 108-118.
- [243] Wang, X.W.; Vermeulen, W.; Coursen, J.D.; Gibson, M.; Lupold, S.E.; Forrester, K.; Xu, G.; Elmore, L.; Yeh, H.; Hoeijmakers, J.H.; Harris, C.C. The XPB and XPD DNA helicases are components of the p53-mediated apoptosis pathway *Genes Dev.* 1996, *10*, 1219-1232.
  - [244] Robles, A.I.; Wang, X.W.; Harris, C.C. Drug-induced apoptosis is delayed and reduced in XPD lymphoblastoid cell lines: possible role of TFIIH in p53-mediated apoptotic cell death *Oncogene.* 1999, *18*, 4681-4688.
  - [245] Kachnic, L.A.; Li, L.; Fournier, L.; Ferraiolo, N.; Dahm-Daphi, J.; Borgmann, K.; Willers, H. FANCD2 but not FANCA promotes cellular resistance to type II topoisomerase poisons *Cancer Lett.* 2011.
  - [246] Campos-Nebel, M.; Larripa, I.; Gonzalez-Cid, M. Topoisomerase II-mediated DNA damage is differently repaired during the cell cycle by non-homologous end joining and homologous recombination *PLoS. One.* 2010, *5*, e12541.
  - [247] Abbott, D.W.; Freeman, M.L.; Holt, J.T. Double-strand break repair deficiency and radiation sensitivity in BRCA2 mutant cancer cells *J. Natl. Cancer Inst.* 1998, *90*, 978-985.
  - [248] Elliott, S.L.; Crawford, C.; Mulligan, E.; Summerfield, G.; Newton, P.; Wallis, J.; Mainou-Fowler, T.; Evans, P.; Bedwell, C.; Durkacz, B.W.; Willmore, E. Mitoxantrone in combination with an inhibitor of DNA-dependent protein kinase: a potential therapy for high risk B-cell chronic lymphocytic leukaemia *Br. J. Haematol.* 2011, *152*, 61-71.
  - [249] Kacinski, B.M.; Rupp, W.D. Interactions of the UVRABC endonuclease in vivo and in vitro with DNA damage produced by antineoplastic anthracyclines *Cancer Res.* 1984, *44*, 3489-3492.
  - [250] Diouf, B.; Cheng, Q.; Krynetskaia, N.F.; Yang, W.; Cheok, M.; Pei, D.; Fan, Y.; Cheng, C.; Krynetskiy, E.Y.; Geng, H.; Chen, S.; Thierfelder, W.E.; Mullighan, C.G.; Downing, J.R.; Hsieh, P.; Pui, C.H.; Relling, M.V.; Evans, W.E. Somatic deletions of genes regulating MSH2 protein stability cause DNA mismatch repair deficiency and drug resistance in human leukemia cells *Nat. Med.* 2011, *17*, 1298-1303.
  - [251] Andera, L.; Wasylyk, B. Transcription abnormalities potentiate apoptosis of normal human fibroblasts *Mol. Med.* 1997, *3*, 852-863.
  - [252] Weksberg, R.; Buchwald, M.; Sargent, P.; Thompson, M.W.; Siminovitch, L. Specific cellular defects in patients with Fanconi anemia *J. Cell Physiol.* 1979, *101*, 311-323.
  - [253] Imamura, O.; Fujita, K.; Shimamoto, A.; Tanabe, H.; Takeda, S.; Furuichi, Y.; Matsumoto, T. Bloom helicase is involved in DNA surveillance in early S phase in vertebrate cells *Oncogene.* 2001, *20*, 1143-1151.



- [254] Kamisugi, Y.; Schaefer, D.G.; Kozak, J.; Charlot, F.; Vrielynck, N.; Hola, M.; Angelis, K.J.; Cuming, A.C.; Nogue, F. MRE11 and RAD50, but not NBS1, are essential for gene targeting in the moss *Physcomitrella patens* *Nucleic Acids Res.* 2012, *40*, 3496-3510.
- [255] Keszenman, D.J.; Salvo, V.A.; Nunes, E. Effects of bleomycin on growth kinetics and survival of *Saccharomyces cerevisiae*: a model of repair pathways *J. Bacteriol.* 1992, *174*, 3125-3132.
- [256] Letavayova, L.; Markova, E.; Hermanska, K.; Vlckova, V.; Vlasakova, D.; Chovanec, M.; Brozmanova, J. Relative contribution of homologous recombination and non-homologous end-joining to DNA double-strand break repair after oxidative stress in *Saccharomyces cerevisiae* *DNA Repair (Amst.)*. 2006, *5*, 602-610.
- [257] Moore, C.W. Responses of radiation-sensitive mutants of *Saccharomyces cerevisiae* to lethal effects of bleomycin *Mutat. Res.* 1978, *51*, 165-180.
- [258] Garcia-Prieto, F.; Gomez-Raja, J.; Andaluz, E.; Calderone, R.; Larriba, G. Role of the homologous recombination genes RAD51 and RAD59 in the resistance of *Candida albicans* to UV light, radiomimetic and anti-tumor compounds and oxidizing agents *Fungal. Genet. Biol.* 2010, *47*, 433-445.
- [259] Rooney, S.; Alt, F.W.; Lombard, D.; Whitlow, S.; Eckersdorff, M.; Fleming, J.; Fugmann, S.; Ferguson, D.O.; Schatz, D.G.; Sekiguchi, J. Defective DNA repair and increased genomic instability in Artemis-deficient murine cells *J. Exp. Med.* 2003, *197*, 553-565.
- [260] Mohapatra, S.; Kawahara, M.; Khan, I.S.; Yannone, S.M.; Povirk, L.F. Restoration of G1 chemo/radioresistance and double-strand-break repair proficiency by wild-type but not endonuclease-deficient Artemis *Nucleic Acids Res.* 2011, *39*, 6500-6510.
- [261] Adachi, N.; Ishino, T.; Ishii, Y.; Takeda, S.; Koyama, H. DNA ligase IV-deficient cells are more resistant to ionizing radiation in the absence of Ku70: Implications for DNA double-strand break repair *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2001, *98*, 12109-12113.
- [262] He, Y.H.; Wu, M.; Kobune, M.; Xu, Y.; Kelley, M.R.; Martin, W.J. Expression of yeast apurinic/apyrimidinic endonuclease (APN1) protects lung epithelial cells from bleomycin toxicity *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 2001, *25*, 692-698.
- [263] Wu, M.; Zhang, Z.; Che, W. Suppression of a DNA base excision repair gene, hOGG1, increases bleomycin sensitivity of human lung cancer cell line *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2008, *228*, 395-402.
- [264] Liu, S.; Lai, Y.; Zhao, W.; Wu, M.; Zhang, Z. Links between DNA polymerase beta expression and sensitivity to bleomycin *Toxicology*. 2011.
- [265] Pietruska, J.R.; Johnston, T.; Zhitkovich, A.; Kane, A.B. XRCC1 deficiency sensitizes human lung epithelial cells to genotoxicity by crocidolite asbestos and Libby amphibole *Environ. Health Perspect.* 2010, *118*, 1707-1713.

- [266] Sato, M.; Niki, T.; Tokou, T.; Suzuki, K.; Fujimura, M.; Ichiishi, A. Genetic analysis of the *Neurospora crassa* RAD14 homolog mus-43 and the RAD10 homolog mus-44 reveals that they belong to the mus-38 pathway of two nucleotide excision repair systems *Genes Genet. Syst.* 2008, *83*, 1-11.
- [267] Fisher, L.A.; Samson, L.; Bessho, T. Removal of reactive oxygen species-induced 3'-blocked ends by XPF-ERCC1 *Chem. Res. Toxicol.* 2011, *24*, 1876-1881.
- [268] Vernole, P.; Tedeschi, B.; Tentori, L.; Levati, L.; Argentin, G.; Cicchetti, R.; Forini, O.; Graziani, G.; D'Atri, S. Role of the mismatch repair system and p53 in the clastogenicity and cytotoxicity induced by bleomycin *Mutat. Res.* 2006, *594*, 63-77.
- [269] Carreau, M.; Alon, N.; Bosnoyan-Collins, L.; Joenje, H.; Buchwald, M. Drug sensitivity spectra in Fanconi anemia lymphoblastoid cell lines of defined complementation groups *Mutat. Res.* 1999, *435*, 103-109.
- [270] Godthelp, B.C.; van Buul, P.P.; Jaspers, N.G.; Elghalbzouri-Maghrani, E.; Duijn-Goedhart, A.; Arwert, F.; Joenje, H.; Zdzienicka, M.Z. Cellular characterization of cells from the Fanconi anemia complementation group, FA-D1/BRCA2 *Mutat. Res.* 2006, *601*, 191-201.
- [271] Maki, Y.; Murakami, J.; Asaumi, J.; Tsujigiwa, H.; Nagatsuka, H.; Kokeguchi, S.; Fukui, K.; Kawai, N.; Yanagi, Y.; Kuroda, M.; Tanaka, N.; Matsubara, N.; Kishi, K. Role of O6-methylguanine-DNA methyltransferase and effect of O6-benzylguanine on the anti-tumor activity of cis-diaminedichloroplatinum(II) in oral cancer cell lines *Oral Oncol.* 2005, *41*, 984-993.
- [272] Keszenman, D.J.; Candreva, E.C.; Sanchez, A.G.; Nunes, E. RAD6 gene is involved in heat shock induction of bleomycin resistance in *Saccharomyces cerevisiae* *Environ. Mol. Mutagen.* 2005, *45*, 36-43.
- [273] Hook, G.J.; Kwok, E.; Heddle, J.A. Sensitivity of Bloom syndrome fibroblasts to mitomycin C *Mutat. Res.* 1984, *131*, 223-230.
- [274] Chu, W.K.; Hanada, K.; Kanaar, R.; Hickson, I.D. BLM has early and late functions in homologous recombination repair in mouse embryonic stem cells *Oncogene*. 2010, *29*, 4705-4714.
- [275] Honma, M.; Tadokoro, S.; Sakamoto, H.; Tanabe, H.; Sugimoto, M.; Furuichi, Y.; Satoh, T.; Sofuni, T.; Goto, M.; Hayashi, M. Chromosomal instability in B-lymphoblastoid cell lines from Werner and Bloom syndrome patients *Mutat. Res.* 2002, *520*, 15-24.
- [276] Moynahan, M.E.; Cui, T.Y.; Jasin, M. Homology-directed dna repair, mitomycin-c resistance, and chromosome stability is restored with correction of a Brca1 mutation *Cancer Res.* 2001, *61*, 4842-4850.
- [277] Yun, J.; Zhong, Q.; Kwak, J.Y.; Lee, W.H. Hypersensitivity of Brca1-deficient MEF to the DNA interstrand crosslinking agent mitomycin C is associated with defect in homologous recombination repair and aberrant S-phase arrest *Oncogene*. 2005, *24*, 4009-4016.

- [278] Hattori, H.; Skoulidis, F.; Russell, P.; Venkitaraman, A.R. Context dependence of checkpoint kinase 1 as a therapeutic target for pancreatic cancers deficient in the BRCA2 tumor suppressor *Mol. Cancer Ther.* 2011, *10*, 670-678.
- [279] Hanlon Newell, A.E.; Hemphill, A.; Akkari, Y.M.; Hejna, J.; Moses, R.E.; Olson, S.B. Loss of homologous recombination or non-homologous end-joining leads to radial formation following DNA interstrand crosslink damage *Cytogenet. Genome Res.* 2008, *121*, 174-180.
- [280] Kim, Y.C.; Koh, J.T.; Shin, B.A.; Ahn, K.Y.; Choi, B.K.; Kim, C.G.; Kim, K.K. An antisense construct of full-length human RAD50 cDNA confers sensitivity to ionizing radiation and alkylating agents on human cell lines *Radiat. Res.* 2002, *157*, 19-25.
- [281] Essers, J.; Hendriks, R.W.; Swagemakers, S.M.; Troelstra, C.; de Wit, J.; Bootsma, D.; Hoeijmakers, J.H.; Kanaar, R. Disruption of mouse RAD54 reduces ionizing radiation resistance and homologous recombination *Cell.* 1997, *89*, 195-204.
- [282] Essers, J.; van Steeg, H.; de Wit, J.; Swagemakers, S.M.; Vermeij, M.; Hoeijmakers, J.H.; Kanaar, R. Homologous and non-homologous recombination differentially affect DNA damage repair in mice *EMBO J.* 2000, *19*, 1703-1710.
- [283] Musio, A.; Marrella, V.; Sobacchi, C.; Rucci, F.; Fariselli, L.; Giliani, S.; Lanzi, G.; Notarangelo, L.D.; Delia, D.; Colombo, R.; Vezzoni, P.; Villa, A. Damaging-agent sensitivity of Artemis-deficient cell lines *Eur. J. Immunol.* 2005, *35*, 1250-1256.
- [284] Pluth, J.M.; Fried, L.M.; Kirchgessner, C.U. Severe combined immunodeficient cells expressing mutant hRAD54 exhibit a marked DNA double-strand break repair and error-prone chromosome repair defect *Cancer Res.* 2001, *61*, 2649-2655.
- [285] Agrelo, R.; Cheng, W.H.; Setien, F.; Roper, S.; Espada, J.; Fraga, M.F.; Herranz, M.; Paz, M.F.; Sanchez-Cespedes, M.; Artiga, M.J.; Guerrero, D.; Castells, A.; von Kobbe, C.; Bohr, V.A.; Esteller, M. Epigenetic inactivation of the premature aging Werner syndrome gene in human cancer *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2006, *103*, 8822-8827.
- [286] Cheng, W.H.; von Kobbe, C.; Opresko, P.L.; Arthur, L.M.; Komatsu, K.; Scidman, M.M.; Carney, J.P.; Bohr, V.A. Linkage between Werner syndrome protein and the Mre11 complex via Nbs1 *J. Biol. Chem.* 2004, *279*, 21169-21176.
- [287] Ramotar, D.; Popoff, S.C.; Gralla, E.B.; Demple, B. Cellular role of yeast Apn1 apurinic endonuclease/3'-diesterase: repair of oxidative and alkylation DNA damage and control of spontaneous mutation *Mol. Cell Biol.* 1991, *11*, 4537-4544.
- [288] Capp, J.P.; Boudsocq, F.; Bertrand, P.; Laroche-Clary, A.; Pourquier, P.; Lopez, B.S.; Cazaux, C.; Hoffmann, J.S.; Canitrot, Y. The DNA polymerase lambda is required for the repair of non-compatible DNA double strand breaks by NHEJ in mammalian cells *Nucleic Acids Res.* 2006, *34*, 2998-3007.



- [289] Shen, M.R.; Zdzienicka, M.Z.; Mohrenweiser, H.; Thompson, L.H.; Thelen, M.P. Mutations in hamster single-strand break repair gene XRCC1 causing defective DNA repair *Nucleic Acids Res.* 1998, *26*, 1032-1037.
- [290] Jaspers, N.G.; Raams, A.; Silengo, M.C.; Wijgers, N.; Niedernhofer, L.J.; Robinson, A.R.; Giglia-Mari, G.; Hoogstraten, D.; Kleijer, W.J.; Hoeijmakers, J.H.; Vermeulen, W. First reported patient with human ERCC1 deficiency has cerebro-oculo-facio-skeletal syndrome with a mild defect in nucleotide excision repair and severe developmental failure *Am. J. Hum. Genet.* 2007, *80*, 457-466.
- [291] Kano, Y.; Fujiwara, Y. Roles of DNA interstrand crosslinking and its repair in the induction of sister-chromatid exchange and a higher induction in Fanconi's anemia cells *Mutat. Res.* 1981, *81*, 365-375.
- [292] Tian, M.; Shinkura, R.; Shinkura, N.; Alt, F.W. Growth retardation, early death, and DNA repair defects in mice deficient for the nucleotide excision repair enzyme XPF *Mol. Cell Biol.* 2004, *24*, 1200-1205.
- [293] Casado, J.A.; Rio, P.; Marco, E.; Garcia-Hernandez, V.; Domingo, A.; Perez, L.; Tercero, J.C.; Vaquero, J.J.; Albella, B.; Gago, F.; Bueren, J.A. Relevance of the Fanconi anemia pathway in the response of human cells to trabectedin *Mol. Cancer Ther.* 2008, *7*, 1309-1318.
- [294] Minko, I.G.; Harbut, M.B.; Kozekov, I.D.; Kozekova, A.; Jakobs, P.M.; Olson, S.B.; Moses, R.E.; Harris, T.M.; Rizzo, C.J.; Lloyd, R.S. Role for DNA polymerase kappa in the processing of N2-N2-guanine interstrand cross-links *J. Biol. Chem.* 2008, *283*, 17075-17082.
- [295] Kohzaki, M.; Hatanaka, A.; Sonoda, E.; Yamazoe, M.; Kikuchi, K.; Vu, T.N.; Szuts, D.; Sale, J.E.; Shinagawa, H.; Watanabe, M.; Takeda, S. Cooperative roles of vertebrate Fbh1 and Blm DNA helicases in avoidance of crossovers during recombination initiated by replication fork collapse *Mol. Cell Biol.* 2007, *27*, 2812-2820.
- [296] Imamura, O.; Fujita, K.; Itoh, C.; Takeda, S.; Furuichi, Y.; Matsumoto, T. Werner and Bloom helicases are involved in DNA repair in a complementary fashion *Oncogene.* 2002, *21*, 954-963.
- [297] Wang, W.; Seki, M.; Narita, Y.; Sonoda, E.; Takeda, S.; Yamada, K.; Masuko, T.; Katada, T.; Enomoto, T. Possible association of BLM in decreasing DNA double strand breaks during DNA replication *EMBO J.* 2000, *19*, 3428-3435.
- [298] Qing, Y.; Yamazoe, M.; Hirota, K.; Dejsuphong, D.; Sakai, W.; Yamamoto, K.N.; Bishop, D.K.; Wu, X.; Takeda, S. The epistatic relationship between BRCA2 and the other RAD51 mediators in homologous recombination *PLoS. Genet.* 2011, *7*, e1002148.
- [299] Malik, M.; Nitiss, J.L. DNA repair functions that control sensitivity to topoisomerase-targeting drugs *Eukaryot. Cell.* 2004, *3*, 82-90.

- [300] Liu, C.; Pouliot, J.J.; Nash, H.A. Repair of topoisomerase I covalent complexes in the absence of the tyrosyl-DNA phosphodiesterase Tdp1 *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2002, *99*, 14970-14975.
- [301] Benton, M.G.; Glasser, N.R.; Palecek, S.P. Deletion of MAG1 and MRE11 enhances the sensitivity of the *Saccharomyces cerevisiae* HUG1P-GFP promoter-reporter construct to genotoxicity *Biosens. Bioelectron.* 2008, *24*, 736-741.
- [302] Nomura, Y.; Adachi, N.; Koyama, H. Human Mus81 and FANCB independently contribute to repair of DNA damage during replication *Genes Cells.* 2007, *12*, 1111-1122.
- [303] Hinz, J.M.; Helleday, T.; Meuth, M. Reduced apoptotic response to camptothecin in CHO cells deficient in XRCC3 *Carcinogenesis.* 2003, *24*, 249-253.
- [304] Arnaudeau, C.; Lundin, C.; Helleday, T. DNA double-strand breaks associated with replication forks are predominantly repaired by homologous recombination involving an exchange mechanism in mammalian cells *J. Mol. Biol.* 2001, *307*, 1235-1245.
- [305] Adachi, N.; So, S.; Koyama, H. Loss of nonhomologous end joining confers camptothecin resistance in DT40 cells. Implications for the repair of topoisomerase I-mediated DNA damage *J. Biol. Chem.* 2004, *279*, 37343-37348.
- [306] Shih, S.J.; Erbele, T.; Chen, A.Y. Ku86 modulates DNA topoisomerase I-mediated radiosensitization, but not cytotoxicity, in mammalian cells *Cancer Res.* 2005, *65*, 9194-9199.
- [307] Chatterjee, S.; Cheng, M.F.; Trivedi, D.; Petzold, S.J.; Berger, N.A. Camptothecin hypersensitivity in poly(adenosine diphosphate-ribose) polymerase-deficient cell lines *Cancer Commun.* 1989, *1*, 389-394.
- [308] Vermeulen, C.; Bertocci, B.; Begg, A.C.; Vens, C. Ionizing radiation sensitivity of DNA polymerase lambda-deficient cells *Radiat. Res.* 2007, *168*, 683-688.
- [309] Zheng, L.; Zhou, M.; Chai, Q.; Parrish, J.; Xue, D.; Patrick, S.M.; Turchi, J.J.; Yannoni, S.M.; Chen, D.; Shen, B. Novel function of the flap endonuclease 1 complex in processing stalled DNA replication forks *EMBO Rep.* 2005, *6*, 83-89.
- [310] Plo, I.; Liao, Z.Y.; Barcelo, J.M.; Kohlhausen, G.; Caldecott, K.W.; Weinfeld, M.; Pommier, Y. Association of XRCC1 and tyrosyl DNA phosphodiesterase (Tdp1) for the repair of topoisomerase I-mediated DNA lesions *DNA Repair (Amst).* 2003, *2*, 1087-1100.
- [311] Barrows, L.R.; Holden, J.A.; Anderson, M.; D'Arpa, P. The CHO XRCC1 mutant, EM9, deficient in DNA ligase III activity, exhibits hypersensitivity to camptothecin independent of DNA replication *Mutat. Res.* 1998, *408*, 103-110.
- [312] Squires, S.; Ryan, A.J.; Strutt, H.L.; Johnson, R.T. Hypersensitivity of Cockayne's syndrome cells to camptothecin is associated with the generation of abnormally high levels of double strand breaks in nascent DNA *Cancer Res.* 1993, *53*, 2012-2019.

- [313] Kerzendorfer, C.; Whibley, A.; Carpenter, G.; Outwin, E.; Chiang, S.C.; Turner, G.; Schwartz, C.; El Khamisy, S.; Raymond, F.L.; O'Driscoll, M. Mutations in Cullin 4B result in a human syndrome associated with increased camptothecin-induced topoisomerase I-dependent DNA breaks *Hum. Mol. Genet.* 2010, *19*, 1324-1334.
- [314] Jacob, S.; Aguado, M.; Fallik, D.; Praz, F. The role of the DNA mismatch repair system in the cytotoxicity of the topoisomerase inhibitors camptothecin and etoposide to human colorectal cancer cells *Cancer Res.* 2001, *61*, 6555-6562.
- [315] Pichierri, P.; Franchitto, A.; Piergentili, R.; Colussi, C.; Palitti, F. Hypersensitivity to camptothecin in MSH2 deficient cells is correlated with a role for MSH2 protein in recombinational repair *Carcinogenesis*. 2001, *22*, 1781-1787.
- [316] Ochi, Y.; Sugawara, H.; Iwami, M.; Tanaka, M.; Eki, T. Sensitive detection of chemical-induced genotoxicity by the Cypridina secretory luciferase reporter assay, using DNA repair-deficient strains of *Saccharomyces cerevisiae* *Yeast*. 2011, *28*, 265-278.
- [317] Kuo, C.C.; Liu, J.F.; Chang, J.Y. DNA repair enzyme, O6-methylguanine DNA methyltransferase, modulates cytotoxicity of camptothecin-derived topoisomerase I inhibitors *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2006, *316*, 946-954.
- [318] Yoshimura, A.; Nishino, K.; Takezawa, J.; Tada, S.; Kobayashi, T.; Sonoda, E.; Kawamoto, T.; Takeda, S.; Ishii, Y.; Yamada, K.; Enomoto, T.; Seki, M. A novel Rad18 function involved in protection of the vertebrate genome after exposure to camptothecin *DNA Repair (Amst)*. 2006, *5*, 1307-1316.
- [319] Scheller, J.; Schurer, A.; Rudolph, C.; Hettwer, S.; Kramer, W. MPH1, a yeast gene encoding a DEAH protein, plays a role in protection of the genome from spontaneous and chemically induced damage *Genetics*. 2000, *155*, 1069-1081.
- [320] Shiomi, N.; Mori, M.; Tsuji, H.; Imai, T.; Inoue, H.; Tateishi, S.; Yamaizumi, M.; Shiomi, T. Human RAD18 is involved in S phase-specific single-strand break repair without PCNA monoubiquitination *Nucleic Acids Res.* 2007, *35*, e9.
- [321] Tian, X.; Chen, G.; Xing, H.; Weng, D.; Guo, Y.; Ma, D. The relationship between the down-regulation of DNA-PKcs or Ku70 and the chemosensitization in human cervical carcinoma cell line HeLa *Oncol. Rep.* 2007, *18*, 927-932.
- [322] Aggarwal, M.; Sommers, J.A.; Shoemaker, R.H.; Brosh, R.M., Jr. Inhibition of helicase activity by a small molecule impairs Werner syndrome helicase (WRN) function in the cellular response to DNA damage or replication stress *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2011, *108*, 1525-1530.
- [323] Christmann, M.; Tomicic, M.T.; Gestrich, C.; Roos, W.P.; Bohr, V.A.; Kaina, B. WRN protects against topo I but not topo II inhibitors by preventing DNA break formation *DNA Repair (Amst)*. 2008, *7*, 1999-2009.
- [324] Smith, L.M.; Willmore, E.; Austin, C.A.; Curtin, N.J. The novel poly(ADP-Ribose) polymerase inhibitor, AG14361, sensitizes cells to topoisomerase I poisons by

- increasing the persistence of DNA strand breaks *Clin. Cancer Res.* 2005, *11*, 8449-8457.
- [325] James, E.; Waldron-Lynch, M.G.; Saif, M.W. Prolonged survival in a patient with BRCA2 associated metastatic pancreatic cancer after exposure to camptothecin: a case report and review of literature *Anticancer Drugs.* 2009, *20*, 634-638.
  - [326] Ambrosini, G.; Seelman, S.L.; Qin, L.X.; Schwartz, G.K. The cyclin-dependent kinase inhibitor flavopiridol potentiates the effects of topoisomerase I poisons by suppressing Rad51 expression in a p53-dependent manner *Cancer Res.* 2008, *68*, 2312-2320.
  - [327] Davidson, D.; Coulombe, Y.; Martinez-Marignac, V.L.; Amrein, L.; Grenier, J.; Hodgkinson, K.; Masson, J.Y.; Aloyz, R.; Panasci, L. Irinotecan and DNA-PKcs inhibitors synergize in killing of colon cancer cells *Invest New Drugs.* 2011.
  - [328] Miknyoczki, S.J.; Jones-Bolin, S.; Pritchard, S.; Hunter, K.; Zhao, H.; Wan, W.; Ator, M.; Bihovsky, R.; Hudkins, R.; Chatterjee, S.; Klein-Szanto, A.; Dionne, C.; Ruggeri, B. Chemopotentiation of temozolomide, irinotecan, and cisplatin activity by CEP-6800, a poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor *Mol. Cancer Ther.* 2003, *2*, 371-382.
  - [329] Calabrese, C.R.; Almassy, R.; Barton, S.; Batey, M.A.; Calvert, A.H.; Canan-Koch, S.; Durkacz, B.W.; Hostomsky, Z.; Kumpf, R.A.; Kyle, S.; Li, J.; Maegley, K.; Newell, D.R.; Notarianni, E.; Stratford, I.J.; Skaltzky, D.; Thomas, H.D.; Wang, L.Z.; Webber, S.E.; Williams, K.J.; Curtin, N.J. Anticancer chemosensitization and radiosensitization by the novel poly(ADP-ribose) polymerase-1 inhibitor AG14361 *J. Natl. Cancer Inst.* 2004, *96*, 56-67.
  - [330] Magrini, R.; Bhonde, M.R.; Hanski, M.L.; Notter, M.; Scherubl, H.; Boland, C.R.; Zeitz, M.; Hanski, C. Cellular effects of CPT-11 on colon carcinoma cells: dependence on p53 and hMLH1 status *Int. J. Cancer.* 2002, *101*, 23-31.
  - [331] Cai, W.; Maldonado, N.V.; Cui, W.; Harutyunyan, N.; Ji, L.; Sposto, R.; Reynolds, C.P.; Keshelava, N. Activity of irinotecan and temozolomide in the presence of O6-methylguanine-DNA methyltransferase inhibition in neuroblastoma pre-clinical models *Br. J. Cancer.* 2010, *103*, 1369-1379.
  - [332] So, S.; Adachi, N.; Lieber, M.R.; Koyama, H. Genetic interactions between BLM and DNA ligase IV in human cells *J. Biol. Chem.* 2004, *279*, 55433-55442.
  - [333] Treszezamsky, A.D.; Kachnic, L.A.; Feng, Z.; Zhang, J.; Tokadjian, C.; Powell, S.N. BRCA1- and BRCA2-deficient cells are sensitive to etoposide-induced DNA double-strand breaks via topoisomerase II *Cancer Res.* 2007, *67*, 7078-7081.
  - [334] Hamilton, N.K.; Maizels, N. MRE11 function in response to topoisomerase poisons is independent of its function in double-strand break repair in *Saccharomyces cerevisiae* *PLoS. One.* 2010, *5*, e15387.
  - [335] Biard, D.S. Untangling the relationships between DNA repair pathways by silencing more than 20 DNA repair genes in human stable clones *Nucleic Acids Res.* 2007, *35*, 3535-3550.

- [336] Adachi, N.; Iizumi, S.; Koyama, H. Evidence for a role of vertebrate Rad52 in the repair of topoisomerase II-mediated DNA damage *DNA Cell Biol.* 2005, *24*, 388-393.
- [337] Adachi, N.; Suzuki, H.; Iizumi, S.; Koyama, H. Hypersensitivity of nonhomologous DNA end-joining mutants to VP-16 and ICRF-193: implications for the repair of topoisomerase II-mediated DNA damage *J. Biol. Chem.* 2003, *278*, 35897-35902.
- [338] Wang, J.; Pluth, J.M.; Cooper, P.K.; Cowan, M.J.; Chen, D.J.; Yannone, S.M. Artemis deficiency confers a DNA double-strand break repair defect and Artemis phosphorylation status is altered by DNA damage and cell cycle progression *DNA Repair (Amst.)* 2005, *4*, 556-570.
- [339] Hosono, Y.; Abe, T.; Ishiai, M.; Takata, M.; Enomoto, T.; Seki, M. The role of SNM1 family nucleases in etoposide-induced apoptosis *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2011, *410*, 568-573.
- [340] Jin, S.; Inoue, S.; Weaver, D.T. Differential etoposide sensitivity of cells deficient in the Ku and DNA-PKcs components of the DNA-dependent protein kinase *Carcinogenesis* 1998, *19*, 965-971.
- [341] Sengupta, S.; Mantha, A.K.; Mitra, S.; Bhakat, K.K. Human AP endonuclease (APE1/Ref-1) and its acetylation regulate YB-1-p300 recruitment and RNA polymerase II loading in the drug-induced activation of multidrug resistance gene MDR1 *Oncogene* 2010, *20*.
- [342] Matsuzaki, Y.; Adachi, N.; Koyama, H. Vertebrate cells lacking FEN-1 endonuclease are viable but hypersensitive to methylating agents and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> *Nucleic Acids Res.* 2002, *30*, 3273-3277.
- [343] Canitrot, Y.; de Murcia, G.; Salles, B. Decreased expression of topoisomerase IIbeta in poly(ADP-ribose) polymerase-deficient cells *Nucleic Acids Res.* 1998, *26*, 5134-5138.
- [344] Lawson, M.H.; Cummings, N.M.; Rassl, D.M.; Russell, R.; Brenton, J.D.; Rintoul, R.C.; Murphy, G. Two novel determinants of etoposide resistance in small cell lung cancer *Cancer Res.* 2011, *71*, 4877-4887.
- [345] Tsai, M.S.; Weng, S.H.; Chen, H.J.; Chiu, Y.F.; Huang, Y.C.; Tseng, S.C.; Kuo, Y.H.; Lin, Y.W. Inhibition of p38 MAPK-dependent excision repair cross-complementing 1 expression decreases the DNA repair capacity to sensitize lung cancer cells to etoposide *Mol. Cancer Ther.* 2012, *11*, 561-571.
- [346] Despras, E.; Pfeiffer, P.; Salles, B.; Calsou, P.; Kuhfittig-Kulle, S.; Angulo, J.F.; Biard, D.S. Long-term XPC silencing reduces DNA double-strand break repair *Cancer Res.* 2007, *67*, 2526-2534.
- [347] Winter, S.; Weller, M. Poly(ADP-ribose) polymerase-independent potentiation of nitrosourea cytotoxicity by 3-aminobenzamide in human malignant glioma cells *Eur. J. Pharmacol.* 2000, *398*, 177-183.



- [348] Lafarge, S.; Sylvain, V.; Ferrara, M.; Bignon, Y.J. Inhibition of BRCA1 leads to increased chemoresistance to microtubule-interfering agents, an effect that involves the JNK pathway *Oncogene*. 2001, 20, 6597-6606.
- [349] Eriksson, A.; Lewensoh, R.; Larsson, R.; Nilsson, A. DNA-dependent protein kinase in leukaemia cells and correlation with drug sensitivity *Anticancer Res.* 2002, 22, 1787-1793.
- [350] Holleman, A.; den Boer, M.L.; Kazemier, K.M.; Beverloo, H.B.; von Bergh, A.R.; Janka-Schaub, G.E.; Pieters, R. Decreased PARP and procaspase-2 protein levels are associated with cellular drug resistance in childhood acute lymphoblastic leukemia *Blood*. 2005, 106, 1817-1823.
- [351] Chen, H.; Shao, C.; Shi, H.; Mu, Y.; Sai, K.; Chen, Z. Single nucleotide polymorphisms and expression of ERCC1 and ERCC2 vis-a-vis chemotherapy drug cytotoxicity in human glioma *J. Neurooncol.* 2007, 82, 257-262.
- [352] Richardson, D.S.; Allen, P.D.; Kelsey, S.M.; Newland, A.C. Effects of PARP inhibition on drug and Fas-induced apoptosis in leukaemic cells *Adv. Exp. Med. Biol.* 1999, 457:267-79., 267-279.
- [353] Moisan, F.; Laroche-Clary, A.; Auzanneau, C.; Ricard, N.; Pourquier, P.; Robert, J.; Le, M., V Deciphering the role of the ERCC2 gene polymorphism on anticancer drug sensitivity *Carcinogenesis*. 2012, 33, 962-968.
- [354] Yang, J.J.; Bhojwani, D.; Yang, W.; Cai, X.; Stocco, G.; Crews, K.; Wang, J.; Morrison, D.; Devidas, M.; Hunger, S.P.; Willman, C.L.; Raetz, E.A.; Pui, C.H.; Evans, W.E.; Relling, M.V.; Carroll, W.L. Genome-wide copy number profiling reveals molecular evolution from diagnosis to relapse in childhood acute lymphoblastic leukemia *Blood*. 2008, 112, 4178-4183.
- [355] Wen, J.; Li, R.; Lu, Y.; Shupnik, M.A. Decreased BRCA1 confers tamoxifen resistance in breast cancer cells by altering estrogen receptor-coregulator interactions *Oncogene*. 2009, 28, 575-586.
- [356] Srinivas, G.; Annab, L.A.; Gopinath, G.; Banerji, A.; Srinivas, P. Antisense blocking of BRCA1 enhances sensitivity to plumbagin but not tamoxifen in BG-1 ovarian cancer cells *Mol. Carcinog.* 2004, 39, 15-25.
- [357] Nagalingam, A.; Tighiouart, M.; Ryden, L.; Joseph, L.; Landberg, G.; Saxena, N.K.; Sharma, D. Med1 plays a critical role in the development of tamoxifen resistance *Carcinogenesis*. 2012, 33, 918-930.
- [358] Chahal, M.; Xu, Y.; Lesniak, D.; Graham, K.; Famulski, K.; Christensen, J.G.; Aghi, M.; Jacques, A.; Murray, D.; Sabri, S.; Abdulkarim, B. MGMT modulates glioblastoma angiogenesis and response to the tyrosine kinase inhibitor sunitinib *Neuro. Oncol.* 2010, 12, 822-833.
- [359] Ko, J.C.; Hong, J.H.; Wang, L.H.; Lin, Y.W. The role of repair protein Rad51 in synergistic cytotoxicity and mutagenicity induced by epidermal growth factor receptor inhibitor (Gefitinib, IressaR) and benzo[a]pyrene in human lung cancer *Exp. Cell Res.* 2008, 314, 1881-1891.

- [360] Ko, J.C.; Hong, J.H.; Wang, L.H.; Cheng, C.M.; Ciou, S.C.; Lin, S.T.; Jheng, M.Y.; Lin, Y.W. Role of repair protein Rad51 in regulating the response to gefitinib in human non-small cell lung cancer cells *Mol. Cancer Ther.* 2008, 7, 3632-3641.
- [361] Chen, R.S.; Jhan, J.Y.; Su, Y.J.; Lee, W.T.; Cheng, C.M.; Ciou, S.C.; Lin, S.T.; Chuang, S.M.; Ko, J.C.; Lin, Y.W. Emodin enhances gefitinib-induced cytotoxicity via Rad51 downregulation and ERK1/2 inactivation *Exp. Cell Res.* 2009, 315, 2658-2672.
- [362] Huang, Y.; Rachid, Z.; Jean-Claude, B.J. MGMT is a molecular determinant for potency of the DNA-EGFR-combi-molecule ZRS1 *Mol. Cancer Res.* 2011, 9, 320-331.
- [363] Moehring, A.; Wohlbald, L.; Aulitzky, W.E.; van der, K.H. Role of poly(ADP-ribose) polymerase activity in imatinib mesylate-induced cell death *Cell Death. Differ.* 2005, 12, 627-636.
- [364] Rosell, R.; Molina, M.A.; Costa, C.; Simonetti, S.; Gimenez-Capitan, A.; Bertran-Alamillo, J.; Mayo, C.; Moran, T.; Mendez, P.; Cardenal, F.; Isla, D.; Provencio, M.; Cobo, M.; Insa, A.; Garcia-Campelo, R.; Reguart, N.; Majem, M.; Viteri, S.; Carcereny, E.; Porta, R.; Massuti, B.; Queralt, C.; de, A., I.; Sanchez, J.M.; Sanchez-Ronco, M.; Mate, J.L.; Ariza, A.; Benlloch, S.; Sanchez, J.J.; Bivona, T.G.; Sawyers, C.L.; Taron, M. Pretreatment EGFR T790M mutation and BRCA1 mRNA expression in erlotinib-treated advanced non-small-cell lung cancer patients with EGFR mutations *Clin. Cancer Res.* 2011, 17, 1160-1168.
- [365] Neri, P.; Ren, L.; Gratton, K.; Stebner, E.; Johnson, J.; Klimowicz, A.; Duggan, P.; Tassone, P.; Mansoor, A.; Stewart, D.A.; Lonial, S.; Boise, L.H.; Bahlis, N.J. Bortezomib-induced "BRCAness" sensitizes multiple myeloma cells to PARP inhibitors *Blood.* 2011, 118, 6368-6379.
- [366] Davies, S.L.; North, P.S.; Dart, A.; Lakin, N.D.; Hickson, I.D. Phosphorylation of the Bloom's syndrome helicase and its role in recovery from S-phase arrest *Mol. Cell Biol.* 2004, 24, 1279-1291.
- [367] Ababou, M.; Dumaire, V.; Lecluse, Y.; Amor-Gueret, M. Cleavage of BLM and sensitivity of Bloom's syndrome cells to hydroxyurea and UV-C radiation *Cell Cycle.* 2002, 1, 262-266.
- [368] Zhang, C.; Liu, Y.; Hu, Z.; An, L.; He, Y.; Hang, H. Targeted deletion of mouse Rad1 leads to deficient cellular DNA damage responses *Protein Cell.* 2011, 2, 410-422.
- [369] Lewis, L.K.; Storici, F.; Van Komen, S.; Calero, S.; Sung, P.; Resnick, M.A. Role of the nuclease activity of *Saccharomyces cerevisiae* Mre11 in repair of DNA double-strand breaks in mitotic cells *Genetics.* 2004, 166, 1701-1713.
- [370] Hartsuiker, E.; Vaessen, E.; Carr, A.M.; Kohli, J. Fission yeast Rad50 stimulates sister chromatid recombination and links cohesion with repair *EMBO J.* 2001, 20, 6660-6671.

- [371] Urbin, S.S.; Elvers, I.; Hinz, J.M.; Helleday, T.; Thompson, L.H. Uncoupling of RAD51 focus formation and cell survival after replication fork stalling in RAD51D null CHO cells *Environ. Mol. Mutagen.* 2012, *53*, 114-124.
- [372] de Vries, F.A.; Zonneveld, J.B.; Duijn-Goedhart, A.; Roodbergen, M.; Boei, J.; van Buul, P.P.; Essers, J.; van Steeg, H.; van Zeeland, A.A.; van Benthem, J.; Pastink, A. Inactivation of RAD52 aggravates RAD54 defects in mice but not in *Schizosaccharomyces pombe* *DNA Repair (Amst).* 2005, *4*, 1121-1128.
- [373] Liu, N.; Lim, C.S. Differential roles of XRCC2 in homologous recombinational repair of stalled replication forks *J. Cell Biochem.* 2005, *95*, 942-954.
- [374] Lundin, C.; Erixon, K.; Arnaudeau, C.; Schultz, N.; Jenssen, D.; Meuth, M.; Helleday, T. Different roles for nonhomologous end joining and homologous recombination following replication arrest in mammalian cells *Mol. Cell Biol.* 2002, *22*, 5869-5878.
- [375] Saintigny, Y.; Delacote, F.; Vares, G.; Petitot, F.; Lambert, S.; Averbek, D.; Lopez, B.S. Characterization of homologous recombination induced by replication inhibition in mammalian cells *EMBO J.* 2001, *20*, 3861-3870.
- [376] Ninomiya, Y.; Suzuki, K.; Ishii, C.; Inoue, H. Highly efficient gene replacements in *Neurospora* strains deficient for nonhomologous end-joining *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2004, *101*, 12248-12253.
- [377] Miyoshi, T.; Sadaie, M.; Kanoh, J.; Ishikawa, F. Telomeric DNA ends are essential for the localization of Ku at telomeres in fission yeast *J. Biol. Chem.* 2003, *278*, 1924-1931.
- [378] Yang, Y.G.; Cortes, U.; Patnaik, S.; Jasin, M.; Wang, Z.Q. Ablation of PARP-1 does not interfere with the repair of DNA double-strand breaks, but compromises the reactivation of stalled replication forks *Oncogene.* 2004, *23*, 3872-3882.
- [379] Elder, R.T.; Song, X.Q.; Chen, M.; Hopkins, K.M.; Lieberman, H.B.; Zhao, Y. Involvement of rhp23, a *Schizosaccharomyces pombe* homolog of the human HHR23A and *Saccharomyces cerevisiae* RAD23 nucleotide excision repair genes, in cell cycle control and protein ubiquitination *Nucleic Acids Res.* 2002, *30*, 581-591.
- [380] Wong, J.M.; Ingles, C.J. A compromised yeast RNA polymerase II enhances UV sensitivity in the absence of global genome nucleotide excision repair *Mol. Gen. Genet.* 2001, *264*, 842-851.
- [381] Johnstone, P.; Reifsteck, C.; Kohler, S.; Worland, P.; Olson, S.; Moses, R.E. Fanconi anemia group A and D cell lines respond normally to inhibitors of cell cycle regulation *Somat. Cell Mol. Genet.* 1997, *23*, 371-377.
- [382] Suhasini, A.N.; Rawtani, N.A.; Wu, Y.; Sommers, J.A.; Sharma, S.; Mosedale, G.; North, P.S.; Cantor, S.B.; Hickson, I.D.; Brosh, R.M., Jr. Interaction between the helicases genetically linked to Fanconi anemia group J and Bloom's syndrome *EMBO J.* 2011, *30*, 692-705.



- [383] Bi, X.; Slater, D.M.; Ohmori, H.; Vaziri, C. DNA polymerase kappa is specifically required for recovery from the benzo[a]pyrene-dihydrodiol epoxide (BPDE)-induced S-phase checkpoint *J. Biol. Chem.* 2005, *280*, 22343-22355.
- [384] Kats, E.S.; Enserink, J.M.; Martinez, S.; Kolodner, R.D. The *Saccharomyces cerevisiae* Rad6 postreplication repair and Siz1/Srs2 homologous recombination-inhibiting pathways process DNA damage that arises in asf1 mutants *Mol. Cell Biol.* 2009, *29*, 5226-5237.
- [385] Bi, X.; Barkley, L.R.; Slater, D.M.; Tateishi, S.; Yamaizumi, M.; Ohmori, H.; Vaziri, C. Rad18 regulates DNA polymerase kappa and is required for recovery from S-phase checkpoint-mediated arrest *Mol. Cell Biol.* 2006, *26*, 3527-3540.
- [386] Okui, T.; Fujiwara, Y. Inhibition of human excision DNA repair by inorganic arsenic and the co-mutagenic effect in V79 Chinese hamster cells *Mutat. Res.* 1986, *172*, 69-76.
- [387] Liu, S.Y.; Wen, C.Y.; Lee, Y.J.; Lee, T.C. XPC silencing sensitizes glioma cells to arsenic trioxide via increased oxidative damage *Toxicol. Sci.* 2010, *116*, 183-193.
- [388] Soares, D.G.; Escargueil, A.E.; Poindessous, V.; Sarasin, A.; de Gramont, A.; Bonatto, D.; Henriques, J.A.; Larsen, A.K. Replication and homologous recombination repair regulate DNA double-strand break formation by the antitumor alkylator ecteinascidin 743 *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2007, *104*, 13062-13067.
- [389] Tavecchio, M.; Simone, M.; Erba, E.; Chiolo, I.; Liberi, G.; Foiani, M.; D'Incalci, M.; Damia, G. Role of homologous recombination in trabectedin-induced DNA damage *Eur. J. Cancer.* 2008, *44*, 609-618.
- [390] Herrero, A.B.; Martin-Castellanos, C.; Marco, E.; Gago, F.; Moreno, S. Cross-talk between nucleotide excision and homologous recombination DNA repair pathways in the mechanism of action of antitumor trabectedin *Cancer Res.* 2006, *66*, 8155-8162.
- [391] Damia, G.; Silvestri, S.; Carrassa, L.; Filiberti, L.; Faircloth, G.T.; Liberi, G.; Foiani, M.; D'Incalci, M. Unique pattern of ET-743 activity in different cellular systems with defined deficiencies in DNA-repair pathways *Int. J. Cancer.* 2001, *92*, 583-588.
- [392] Soares, D.G.; Poletto, N.P.; Bonatto, D.; Salvador, M.; Schwartzmann, G.; Henriques, J.A. Low cytotoxicity of ecteinascidin 743 in yeast lacking the major endonucleolytic enzymes of base and nucleotide excision repair pathways *Biochem. Pharmacol.* 2005, *70*, 59-69.
- [393] Zewail-Foote, M.; Li, V.S.; Kohn, H.; Bearss, D.; Guzman, M.; Hurley, L.H. The inefficiency of incisions of ecteinascidin 743-DNA adducts by the UvrABC nuclease and the unique structural feature of the DNA adducts can be used to explain the repair-dependent toxicities of this antitumor agent *Chem. Biol.* 2001, *8*, 1033-1049.

- [394] Erba, E.; Bergamaschi, D.; Bassano, L.; Damia, G.; Ronzoni, S.; Faircloth, G.T.; D'Incalci, M. Ecteinascidin-743 (ET-743), a natural marine compound, with a unique mechanism of action *Eur. J. Cancer*. 2001, 37, 97-105.
- [395] Takebayashi, Y.; Pourquier, P.; Zimonjic, D.B.; Nakayama, K.; Emmert, S.; Ueda, T.; Urasaki, Y.; Kanzaki, A.; Akiyama, S.I.; Popescu, N.; Kraemer, K.H.; Pommier, Y. Antiproliferative activity of ecteinascidin 743 is dependent upon transcription-coupled nucleotide-excision repair *Nat. Med.* 2001, 7, 961-966.
- [396] Ren, S.; Xu, C.; Cui, Z.; Yu, Y.; Xu, W.; Wang, F.; Lu, J.; Wei, M.; Lu, X.; Gao, X.; Liang, Y.; Mao, J.H.; Sun, Y. Oncogenic CUL4A determines the response to thalidomide treatment in prostate cancer *J. Mol. Med. (Berl)*. 2012.
- [397] Imesch, P.; Dedes, K.J.; Furlato, M.; Fink, D.; Fedier, A. MLH1 protects from resistance acquisition by the histone deacetylase inhibitor trichostatin A in colon tumor cells *Int. J. Oncol.* 2009, 35, 631-640.
- [398] Fishel, M.L.; Colvin, E.S.; Luo, M.; Kelley, M.R.; Robertson, K.A. Inhibition of the redox function of APE1/Ref-1 in myeloid leukemia cell lines results in a hypersensitive response to retinoic acid-induced differentiation and apoptosis *Exp. Hematol.* 2010, 38, 1178-1188.
- [399] Berry, D.M.; Williams, K.; Meckling-Gill, K.A. All trans retinoic acid induces apoptosis in acute promyelocytic NB4 cells when combined with isoquinolinediol, a poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor *Leuk. Res.* 2000, 24, 307-316.

### **3. ANTECEDENTES**

### 3. ANTECEDENTES

#### *3.3.2. Utilización de las alteraciones metabólicas de las células cancerosas como herramienta en la búsqueda de fármacos selectivos contra el cáncer.*

Desde principios del s. XX se sabe que las células tumorales poseen un metabolismo distinto al que presentan las células normales. Las primeras observaciones de esta diferencias fueron llevadas a cabo por el premio Nobel Otto Warburg<sup>21</sup>. Sin embargo, las primeras hipótesis que se desarrollaron no aclaraban el proceso de carcinogénesis. Al mismo tiempo, empezaron a surgir varias teorías sobre el origen del cáncer como un proceso de adquisición de mutaciones genéticas. Todo esto hizo que las investigaciones en cáncer dejaran de lado el metabolismo y se centraran en las alteraciones genéticas como las posibles dianas terapéuticas contra el cáncer. Desde entonces, las investigaciones en cáncer han demostrado que las características que definen una célula tumoral provienen de la adquisición de un fenotipo originado por una serie de alteraciones genéticas. Estas alteraciones genéticas consisten en mutaciones, translocaciones, amplificaciones o eliminación de genes que van a contribuir al desarrollo del cáncer. En las últimas décadas, la investigación se ha centrado en la búsqueda de terapias encaminadas a corregir o aprovechar estas alteraciones genéticas para eliminar células cancerosas. Sin embargo, el descubrimiento de nuevos genes implicados en el cáncer no deja de aumentar cada día, a lo que se le suma que las alteraciones genéticas pueden variar según el tipo de cáncer y la persona afectada. Esto ha hecho que se empiece a replantear otras posibles dianas terapéuticas contra el cáncer. En la búsqueda de estas nuevas dianas, en la última década se ha vuelto a reiniciar las investigaciones sobre el metabolismo celular y el microambiente de los tumores<sup>25-29</sup>. Durante años se ha estado pensando que el metabolismo alterado que presentan las células cancerosas se debe a las alteraciones genéticas de éstas y que el metabolismo no tenía un papel fundamental en el proceso carcinogénico, sino que era una consecuencia final. Sin embargo, con el reinicio de las investigaciones en el metabolismo del cáncer, se ha podido relacionar que ciertas alteraciones genéticas que se producen durante el inicio del proceso de carcinogénesis tienen como consecuencia directa la reprogramación del metabolismo celular que no solamente va a estar destinado a la síntesis de macromoléculas para el soporte de la proliferación y la supervivencia celular, sino que también va a participar en la inestabilidad genética, contribuyendo al proceso de carcinogénesis<sup>25-29</sup>. La reprogramación del metabolismo celular durante el inicio de la carcinogénesis es fundamental para poder mantener saciadas las tres necesidades básicas que se producen durante una rápida proliferación celular como es la que presentan las células cancerosas: una rápida generación de ATP para poder mantener el estatus energético, una incrementada biosíntesis de macromoléculas y el mantenimiento del equilibrio redox celular<sup>4,26,27,29-32</sup>. Por todo ello, esta reprogramación del metabolismo va a afectar a las cuatro principales clases de macromoléculas: carbohidratos, proteínas, lípidos y ácidos nucleicos. Se sabe que las células cancerosas tienen alterado el metabolismo de todas estas

### 3. ANTECEDENTES

macromoléculas<sup>26</sup>, con lo que fármacos que tengan como diana el metabolismo celular podrían ser efectivos. De hecho, este tipo de fármacos tienen precedentes históricos como son los antimetabolitos análogos de nucleósidos (como el 5-fluorouracilo) y los antifolatos (como el metotrexato) que inhiben la síntesis de los ácidos nucleicos<sup>26</sup>. Aunque estos fármacos no fueron clasificados como moléculas que alterasen el metabolismo sino como fármacos que dañan el ADN, claramente tienen el metabolismo celular como una de sus dianas.

Para poder desarrollar nuevas estrategias terapéuticas teniendo como base el metabolismo celular, lo primero que se tuvo que tener en cuenta fue los motivos de la necesidad de la reprogramación del metabolismo celular por parte de las células cancerosas. La proliferación celular consiste en un proceso celular por el cual una célula acaba dividiéndose en dos células hijas. La división en dos células requiere que la célula original duplique todos los componentes necesarios para la formación de las nuevas células. Durante este proceso de duplicación, se consume una gran cantidad de energía para poder sintetizar todas las nuevas macromoléculas. La gran mayoría de los cánceres dependen de la glucosa y la glutamina como las principales fuentes energéticas y precursoras del resto de macromoléculas. El metabolismo de la glucosa se ha convertido en los últimos años en una posible nueva diana terapéutica, debido a que gran parte de los cánceres dependen de la glicólisis, ruta catabólica de la glucosa, como su principal vía para la generación de energía y como precursora de otras macromoléculas<sup>25</sup>.

Por otra parte, uno de los productos del metabolismo celular es la generación de radicales libres (especies reactivas de oxígeno o ERO, entre otros). Como consecuencia de la reprogramación celular que sufren las células cancerosas, éstas presentan mayores niveles basales de EROs que las células normales<sup>33,34</sup>. En los últimos años, se ha comenzado a estudiar esta diferencia de los niveles de EROs como una nueva estrategia terapéutica para el desarrollo de fármacos anticancerosos selectivos.

A continuación se explicarán con más detalles las dos estrategias basadas en el metabolismo celular utilizadas durante esta tesis para la búsqueda de nuevos fármacos para el tratamiento del cáncer de pulmón: la utilización de agentes prooxidantes e inhibidores de glicólisis.

### 3. ANTECEDENTES

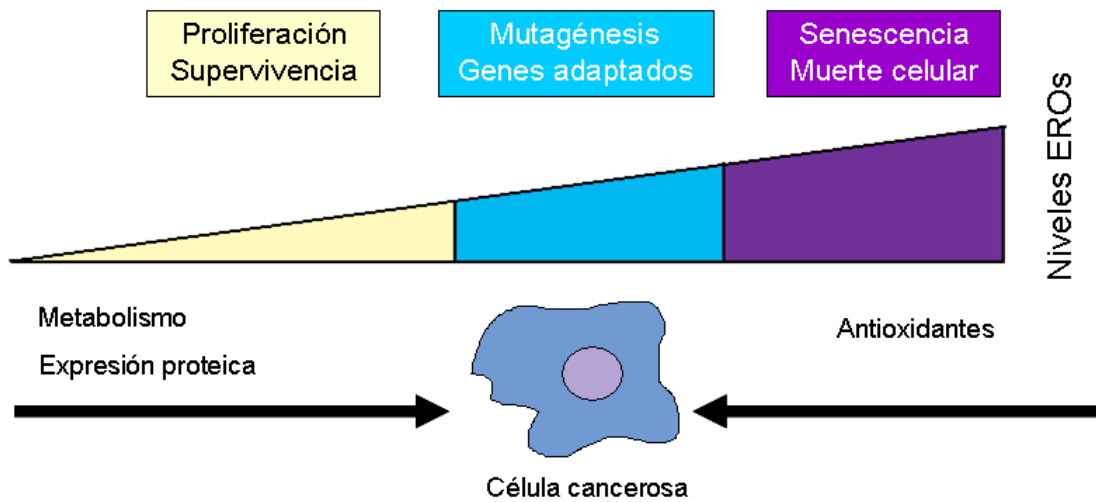
3.3.2.1. Valoración de la utilización de agentes prooxidantes para la inducción de muerte selectiva de células cancerosas.

Un radical libre es una molécula química (orgánica o inorgánica) que posee un electrón desapareado, con lo que es inestable y reaccionará con moléculas de su alrededor para poder conseguir la estabilidad. En biología, los radicales libres más importantes son las Especies Reactivas de Oxígeno (EROs) y las Especies Reactivas de Nitrógeno. ERO es un término que agrupa radicales de oxígeno (incluyendo radical hidroxilo y radical superóxido) y derivados no radicales de oxígeno (como el peróxido de hidrógeno)<sup>35,36</sup>.

En las células, las EROs pueden ser originadas por fuentes endógenas o por fuentes exógenas. Las fuentes exógenas pueden ser de naturaleza muy variada, como por ejemplo elementos de la polución, el humo del tabaco, la radiación, etc. Al igual que las fuentes exógenas, los mecanismos endógenos de generación de EROs también pueden ser muy variados. Algunas de los mecanismos endógenos son la fosforilación oxidativa (OXPHOS), los peroxisomas y la activación de células inflamatorias (estas células utilizan la producción de EROs para la eliminación de agentes patógenos). En las células, la principal fuente de EROs es la mitocondria. Durante la OXPHOS, la mayoría del oxígeno consumido es reducido a agua; sin embargo, sobre un 5% de las moléculas de oxígeno es convertido en anión superóxido debido a un fallo del acoplamiento de los electrones y los protones en la cadena respiratoria. Este anión superóxido puede ser convertido en otras EROs, como radicales hidroxilo y peróxido de hidrógeno<sup>34,36,37</sup>.

Las EROs son consideradas una “espada de doble filo”. Por un lado, las EROs son esenciales para determinadas funciones biológicas. Bajas concentraciones de EROs van a ser necesarias para la supervivencia, el crecimiento y la diferenciación celular. Esto se debe a la intervención de las EROs en la regulación de vías de transducción de señales y sobre la actividad de determinadas enzimas, al modificar la estructura de proteínas y genes con las que reaccionan directa o indirectamente<sup>36</sup>. Por otro lado, excesivas cantidades de EROs pueden desencadenar daño oxidativo irreversible sobre biomoléculas (como el ADN, proteínas y lípidos). Destaca el daño que las EROs pueden producir sobre el ADN. Se ha descrito que las EROS pueden directamente producir roturas de las cadenas de ADN (tanto roturas simples como dobles), modificaciones sobre las bases nitrogenadas que componen el ADN (destacando la oxidación de la guanina, dando lugar a la 8-hidroxiguanosina) e inter cruzamientos entre las cadenas de ADN. Este daño oxidativo puede acabar desencadenando la muerte celular o favoreciendo el desarrollo de condiciones patológicas como inflamación, aterosclerosis, envejecimiento y cáncer (Figura 10)<sup>33,34</sup>.

### 3. ANTECEDENTES



*Figura 10. Relación entre los niveles de EROs y cáncer. El efecto biológico de las EROs dependerá de sus niveles intracelulares. Niveles bajos de EROs (amarillo) tienen efectos beneficiosos sobre la proliferación y supervivencia celular. Sin embargo, niveles excesivamente altos (morado) causan muerte celular. Las células utilizan los antioxidantes para prevenir el alcance de niveles elevados de EROs. Las células cancerosas presentan niveles de EROs más elevados de lo normal (azul) pero por debajo de los niveles que inducirían muerte celular. Fuente original: Targeting cancer cells by ROS-mediated mechanisms: a radical therapeutic approach? <sup>36</sup>*

Por tanto, mantener un equilibrio de los niveles de EROs es crucial para el crecimiento y la supervivencia celular. Por este motivo las células han desarrollado un sistema de defensa contra las EROs, incluyendo enzimas antioxidantes y vías de reparación del daño generado por las EROs. Las enzimas antioxidantes incluyen superóxido dismutasas (encargadas de la eliminación de anión superóxido), glutatión peroxidasa (se encarga de la eliminación de peróxido de hidrógeno mediante la utilización de glutatión), catalasa (encargada de la eliminación de peróxido de hidrógeno), entre otros<sup>34,36</sup>. Dentro de las vías de reparación de los daños generados por las EROs destacan las vías de reparación del daño en el ADN, principalmente la vía de reparación por escisión de bases o BER.

Cuando el balance redox se desequilibra por una insuficiencia de los mecanismos de defensa, por una excesiva producción de EROs o por ambas, se produce lo que se conoce como estrés oxidativo. Elevados niveles de EROs y de estrés oxidativo han sido ampliamente observados en las células cancerosas. Este incrementado estrés oxidativo parece jugar un papel fundamental en la carcinogénesis. Aunque los mecanismos que generan un aumento del estrés

### 3. ANTECEDENTES

oxidativo en las células cancerosas no están del todo claro, sí que se ha asociado la activación de ciertos oncogenes (como la activación del oncogén MYC), la reprogramación metabólica, la disfunción mitocondrial (mutaciones en el ADN mitocondrial que afectan a la funcionalidad de los elementos de la cadena de transportadores de electrones) y la pérdida de la funcionalidad del gen p53 con el incremento de la producción de EROs en las células tumorales<sup>34,36</sup>. Esta excesiva producción de EROs va a inducir más alteraciones genéticas (especialmente en el genoma mitocondrial) que van a contribuir al aumento de la inestabilidad genética del cáncer, que a su vez van a aumentar la producción de EROs, entrando en un círculo “vicioso” que va a contribuir al desarrollo del cáncer. Por otra parte, como se comentó anteriormente, las EROS tienen un papel fundamental en la regulación de la expresión de genes responsables de la proliferación celular, evasión de la muerte celular, la invasión, etc., por lo que los elevados niveles de EROs van a contribuir de este modo también a la carcinogénesis. Sin embargo, excesivos niveles de EROs pueden llegar a inducir la muerte celular. Para evitarlo, las células cancerosas han desarrollado una serie de sistemas de adaptación a este elevado estrés oxidativo como un elevado aumento de la producción de determinadas enzimas y moléculas antioxidantes (como la superóxido dismutasa o el glutatión) o la reprogramación del metabolismo para compensar esos elevados niveles de EROS<sup>33,37</sup>.

El estrés oxidativo elevado que presentan las células cancerosas hace pensar que agentes antioxidantes podrían actuar previniendo la carcinogénesis, mientras que agentes prooxidantes incrementarían los niveles de EROs, contribuyendo a ella. Es de destacar que un mismo agente puede tener efectos antioxidantes y prooxidantes dependiendo de su concentración. Esta dualidad está empezando a ser estudiada para su utilización en la terapia del cáncer. Como ya se ha comentado, las células normales mantienen unos niveles basales de EROs reducidos mientras que las células cancerosas presentan niveles elevados. Un aporte exógeno de EROs controlado podría hacer que los niveles de EROs superasen el umbral tolerado en las células cancerosas desencadenando la muerte de éstas, mientras que ese mismo incremento de EROs no superaría el umbral de tolerancia de las células normales al tener menores niveles basales de EROs (Figura 11)<sup>33,36</sup>. Por tanto, el uso de concentraciones específicas de un agente prooxidante podría matar de forma selectiva a células cancerosas, sin afectar a las células normales. De hecho, en los últimos años se ha demostrado que la generación de EROs participa en la actividad anticancerosa de muchos agentes antineoplásicos usados en la terapia actual, como los compuestos de platino (como el cisplatino), los inhibidores de topoisomerasas (como el etopósido), taxanos (como docetaxel), entre otros. Aunque esta generación de EROs no sea el principal mecanismo de acción de estos fármacos, podría ser la causa de la selectividad de éstos, puesto que su mecanismo principal afecta por igual tanto a células cancerosas como a células normales. Por todo esto, en los últimos años los agentes prooxidantes han empezado a ganar



### 3. ANTECEDENTES

importancia como posible nuevo grupo de fármacos antineoplásicos selectivos. Con el objetivo de identificar agentes prooxidantes, durante esta tesis se ha colaborado en la realización de la revisión titulada *Pro-Oxidant Natural Products as Anticancer Agents*, que es adjuntada a final de este apartado, en la cual se han recogido los productos naturales prooxidantes que han demostrado actividad anticancerosa. El motivo de escoger productos naturales para realizar esta revisión se debe al hecho de que la gran mayoría de los fármacos actuales tienen su origen o están relacionados con productos naturales, incluyendo los fármacos antineoplásicos, de los cuales el 73% está relacionado con productos naturales<sup>38</sup>. De hecho, algunos de los productos recogidos en esta revisión son fármacos utilizados en la quimioterapia actual (por ejemplo vinblastina, bleomicina, mitomicina, etc.) y otros se encuentran siendo evaluados en ensayos clínicos (como la curcumina, el sulforafano, la vitamina C, etc.). Por otra parte, esta revisión ayudó en la elección de los agentes prooxidantes que fueron evaluados en esta tesis para la valoración de su utilización en el tratamiento del cáncer de pulmón, como el hidroxitirosol y el sulforafano.

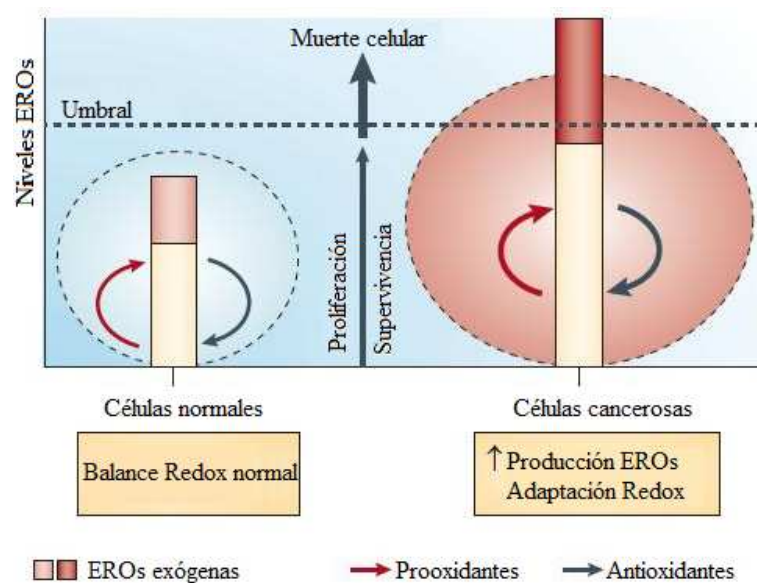


Figura 11. Efecto del aporte exógeno de EROs. Un incremento en el nivel de EROs en las células cancerosas (barra roja) por un aporte exógeno superaría el umbral de tolerancia de éstas, induciendo la muerte celular, mientras que ese mismo incremento (barra rosa) no pasaría el umbral de tolerancia de las células normales. Fuente original: “Targeting cancer cells by ROS-mediated mechanisms: a radical therapeutic approach?”<sup>36</sup>.

# Pro-Oxidant Natural Products as Anticancer Agents

C. Martín-Cordero, A.J. León-González, J.M. Calderón-Montaña, E. Burgos-Morón and M. López-Lázaro\*

*Department of Pharmacology, Faculty of Pharmacy, University of Seville, Seville, Spain*

**Abstract:** Cancer cells produce high levels of reactive oxygen species (ROS) that lead to a state of increased basal oxidative stress. Since this state of oxidative stress makes cancer cells vulnerable to agents that further augment ROS levels, the use of pro-oxidant agents is emerging as an exciting strategy to selectively target tumor cells. Natural products have provided a significant contribution to the development of several drugs currently used in cancer chemotherapy. Although many natural products are known to affect the redox state of the cell, most studies on these compounds have focused on their antioxidant activity instead of on their pro-oxidant properties. This article provides an overview of natural products with pro-oxidant and anticancer activities, with special focus on plant secondary metabolites, and discusses their possible use as cancer chemotherapeutic agents.

**Keywords:** cancer, plant secondary metabolites, phenolic compounds, terpenoids, alkaloids, prooxidant, reactive oxygen species, hydrogen peroxide.

## INTRODUCTION

Cancer kills over seven million people worldwide every year [1]. The mortality rate of this disease has not changed much in the past few decades even in developed countries as the United States [2]. Although cancer therapy in the form of surgery or radiotherapy is effective when the disease is early detected, many cancers are still diagnosed when cells from a primary tumor have already metastasized to other parts of the body. The main form of treatment at this point is chemotherapy, which consists of delivering drugs systemically so that they can reach and kill the tumor cells. But most of these drugs cause severe side effects in patients and, therefore, need to be used at suboptimal levels. The low efficacy of chemotherapy in patients with advanced cancers is reflected in the low 5-year survival rates observed in these patients [2]. For example, cancer statistics show that the most commonly diagnosed cancer in the world is lung cancer [1], that approximately 50% of patients diagnosed with this type of cancer have distant metastasis [2] and that only 3% of these patients manage to survive more than 5 years [2]. The low efficacy of cancer therapy for the treatment of patients with metastasis makes the development of novel chemotherapeutic agents necessary.

Despite the recent interest by pharmaceutical companies in molecular modeling, combinatorial chemistry and other synthetic chemistry techniques, natural products and medicinal plants continue to be an important source of new drugs. Natural products are not only used as therapeutic agents, but are also a source of lead compounds that have provided the basis for the semisynthesis or total synthesis of new drugs. An analysis of the sources of drugs approved from January

1981 to the middle of October 2008 revealed that 6% of the 1024 new chemical entities were unmodified natural products and that only 37% were drugs not related to natural products [3, 4]. The role these latter in drug discovery is particularly relevant in oncology. It is estimated that over the time frame from around the 1940s to 2006, of the 155 small molecules approved for cancer therapy, only 27% were not related to natural products [3]. The first plant-derived anticancer agents to advance into clinical use were the *Vinca* alkaloids vinblastine and vincristine. Other important plant-derived anticancer compounds include paclitaxel (taxol), the epipodophyllotoxin derivative etoposide, and the camptothecin derivatives topotecan and irinotecan [5]. The mechanism of action of these drugs is considered to consist in the inhibition of microtubule assembly (*Vinca* alkaloids and paclitaxel), inhibition of DNA topoisomerase II (etoposide) and inhibition of DNA topoisomerase I (camptothecin derivatives). Recent evidence suggests that the formation of reactive oxygen species (ROS) may also contribute to the anticancer effects of these drugs [6-8]. The induction of oxidative stress by pro-oxidant agents is indeed emerging as an attractive anticancer strategy that may be used to target cancer cells selectively [9-13]. After discussing the role of oxidative stress in cancer and the possible use of pro-oxidant agents in cancer therapy, this article provides an overview of pro-oxidant natural products with anticancer activity and examines their potential as cancer chemotherapeutic agents.

## OXIDATIVE STRESS IN CANCER CELLS

Oxidative stress is an imbalance between the generation and elimination of reactive oxygen species in favor of the former, causing excessive oxidative damage to macromolecules, cells and tissues. Reactive oxygen species (ROS) is the collective term used to name oxygen radicals (including hydroxyl radical and superoxide radical) and some other non-radical derivatives of oxygen, such as hydrogen peroxide

\*Address correspondence to this author at the Department of Pharmacology, Faculty of Pharmacy, Profesor García González 2, 41012 Sevilla, Spain; Tel: + 34 954 55 63 48; Fax: + 34 954 55 60 74; E-mail: mlopezlazaro@us.es

( $H_2O_2$ ). ROS can easily generate free radicals (any species containing one or more unpaired electrons) and/or cause oxidative damage [14]. ROS are generated by all aerobic organisms and their production seems to be needed for signal-transduction pathways that regulate several different physiological processes. Excessive amounts of ROS, however, can start toxic and lethal chain reactions, which oxidize and disable structures that are required for cellular integrity and survival. ROS are generated in multiple compartments and by multiple enzymes within the cell. Important contributions include proteins within the plasma membrane, such as the growing family of NADPH oxidases; lipid metabolism within the peroxisomes; as well as the activity of various cytosolic enzymes such as cyclooxygenases. Although all these sources contribute to the overall ROS production, the vast majority of cellular ROS can be traced back to the mitochondria [15, 16].

Accumulating evidence indicates that cancer cells generate excessive levels of ROS and have a state of oxidative stress. Many malignant cells produce high levels of ROS in culture. For instance, Szatrowski and Nathan reported that several tumor cell lines, representing a variety of tissue types, constitutively produced large amounts of  $H_2O_2$ . They observed that the cumulative amount of  $H_2O_2$  produced after 4 h by these tumor cells was comparable to the amount of  $H_2O_2$  produced by similar numbers of phorbol ester-triggered neutrophils [17]. The increased production of ROS by cancer cells observed *in vitro* has also been found *in vivo*. For example, chronic lymphocytic leukemia cells freshly taken from patients showed increased ROS production compared with normal lymphocytes. This was also observed with B-cell lines from patients with Burkitt's lymphoma associated with Epstein-Barr virus infection and malignant B-cells from patients with hairy cell leukemia (see [18] and references therein). For solid tumors, however, demonstrating increased ROS production *in vivo* is difficult to achieve owing to methodological inadequacies, so most researchers have studied oxidative damage levels rather than ROS production. Such studies have shown increased levels of oxidative damage (e.g. 8OHdG) in human cancers and in animal cancers induced by a wide range of carcinogens (reviewed in [18]). Interestingly, the most important carcinogenic agents and behaviors induce oxidative stress, including most chemical carcinogens (e.g. *N*-nitrosamines, asbestos, arsenic), ultraviolet radiation, cancer-associated viruses or bacteria, inflammation, alcohol, tobacco smoke and obesity. It is also recognized that age is the principal risk factor for most cancers and that oxidative stress may be the most important causal factor in aging (see [19, 20] and references therein).

The increased levels of ROS of cancer cells seem to play a key role in cancer development [12, 18, 21]. ROS such as  $H_2O_2$  can induce cell malignant transformation, and the malignant phenotype of tumor cells can be reversed by decreasing the levels of ROS [12, 22-24]. For instance, expression of the ROS generation system Nox1 in normal NIH3T3 fibroblasts resulted in cells with malignant characteristics that produced tumors in athymic mice. These transformed cells showed a 10-fold increase in  $H_2O_2$  levels. When human catalase was expressed in these transformed cells,  $H_2O_2$  concentration decreased, and the cells reverted to a normal appearance, the growth rate normalized, and cells no longer pro-

duced tumors in athymic mice [24]. In addition, ROS have been shown to participate in the most relevant aspects of carcinogenesis. Most researchers consider that cancer is a genetic disease caused by the acquisition of multiple mutations in genes that control cell proliferation, cell death and genomic instability [25]. It is also accepted that cells must develop several acquired capabilities in order to become a malignant cancer: increased cell proliferation (caused, in part, by resistance to growth inhibition and independence from mitogenic stimulation), apoptosis resistance, cellular immortalization, increased angiogenesis, invasion and metastasis. In addition, genetic instability is considered to be a key event that enables the acquisition of these capabilities [26, 27]. Accumulating experimental data indicate that an increase in the cellular concentrations of ROS such as  $H_2O_2$  can explain all these hallmarks of cancer. It is known that an increase in the levels of  $H_2O_2$  can lead to DNA damage, mutations, and genetic instability [26-31];  $H_2O_2$ -induced DNA damage seems to be mediated by hydroxyl radical generated from  $H_2O_2$  by the Fenton reaction [28-30]. Several studies have also demonstrated that ROS can induce cell proliferation [31], apoptosis resistance [32, 33], increased angiogenesis [34, 35], and invasion and metastasis [36-38]. Indeed, these studies showed that an increase in the levels of  $H_2O_2$ -detoxifying enzymes could reduce cell proliferation, promote apoptosis, and inhibit invasion, metastasis and angiogenesis. In short, cancer cells produce high levels of ROS that lead to a state of increased basal oxidative stress. Such state of oxidative stress is induced by the most important human carcinogens and plays an important role in cancer development.

## SELECTIVE ANTICANCER ACTIVITY OF PRO-OXIDANT AGENTS

Since cancer cells have increased levels of ROS that play an important role in carcinogenesis, agents with antioxidant activity may induce cancer preventive effects by reducing and/or preventing such increase in the cellular levels of ROS. Because pro-oxidant agents increase the cellular levels of ROS, it is recognized that these agents can induce carcinogenic effects. But when pro-oxidant agents increase the cellular levels of ROS to cytotoxic levels, these agents may induce selective killing of cancer cells and be therapeutically useful. It is important to mention that all these effects can be achieved by agents with both antioxidant and pro-oxidant properties (e.g. curcumin), which can act as cancer chemopreventive, carcinogenic, and chemotherapeutic agents mainly depending on the concentration by which they are used [12, 39].

The role of ROS in cancer therapy is increasingly being acknowledged and the induction of oxidative stress by pro-oxidant agents is emerging as an attractive anticancer strategy [9-12, 40-43]. Recent data suggests that ROS participate in the anticancer activity of many chemotherapeutic agents commonly used in the clinic, including paclitaxel, docetaxel, cisplatin, doxorubicin, arsenic trioxide, bortezomib, procarbazine and etoposide [6-8, 10, 40, 44-54]. For instance, although it has been known for many years that the microtubule protein tubulin is the therapeutic target for paclitaxel (taxol), recent experiments have shown that the accumulation of  $H_2O_2$  is a crucial step for paclitaxel-induced cancer cell death both *in vitro* and *in vivo* [6, 8].  $H_2O_2$  seems to be a



key player in oxidative stress-induced cancer cell death. Many anticancer agents increase the levels of  $H_2O_2$  [6, 45, 47], and  $H_2O_2$  is known to be an efficient inducer of cell death in cancer cells [12, 48, 55]. Interestingly, cancer cells are more susceptible to  $H_2O_2$ -induced cell death than non-malignant cells [56-58]. Using several cancer and normal cell lines, Chen *et al.* [56] observed that high concentrations of ascorbic acid selectively killed a variety of cancer cells and that this effect was mediated by  $H_2O_2$ . They showed, for instance, that a concentration of 50  $\mu M$   $H_2O_2$  induced more percentage of cell death in Burkitt's lymphoma cells than 250  $\mu M$  in normal lymphocytes and normal monocytes [56]. This selective effect of  $H_2O_2$  has also been observed in cells derived from solid tumors. Using lung cancer cells and non-malignant lung fibroblasts under the same experimental conditions, we recently found that specific concentrations of  $H_2O_2$  and of the  $H_2O_2$ -generating agent pyrogallol induced selective killing of the cancer cells [59].

It is not clear why specific concentrations of  $H_2O_2$  (and of pro-oxidant agents) can kill cancer cells selectively. *In vitro* and *in vivo* data indicate that tumor cells produce higher concentrations of  $H_2O_2$  than their normal counterparts [17, 18, 31, 60-62]. This, and the fact that there is a threshold of  $H_2O_2$  above which cells cannot survive, may explain why specific concentrations of  $H_2O_2$  induce selective killing of cancer cells [12]. Excessive cellular accumulation of  $H_2O_2$  may cause cell death through the induction of DNA damage, which seems to be mediated by hydroxyl radical generated from  $H_2O_2$  in the presence of iron or copper (Fenton reaction) [28-30]. Unlike non-malignant cells, cancer cells have mutations in DNA repair genes and cannot properly repair specific types of DNA damage [25, 63]. It is possible that some cancers may have a reduced capacity to repair ROS-induced DNA damage and be more vulnerable than normal cells to the cytotoxic activity of ROS. It has also been proposed that the increased levels of copper found in various malignancies may explain why some pro-oxidant agents (e.g. plant polyphenols) can induce selective killing of cancer cells [64]. The increased levels of copper of cancer cells would favor the formation of higher levels of hydroxyl radical through the Fenton reaction.

## PRO-OXIDANT NATURAL PRODUCTS WITH ANTICANCER ACTIVITY

An overview of natural products with both pro-oxidant and anticancer activities is presented in Table 1. The name of the natural product, the type of compound, the natural source (representative species) and the references are provided. The first part of the Table comprises plant compounds of primary metabolism and their derivatives. Then, plant secondary metabolites, including phenolic compounds, terpenoids and alkaloids, are compiled. The last section includes other natural products from different natural sources (compounds of animal, microorganism, or marine origin, vitamins, etc). The mechanism involved in the generation of ROS is not available for most compounds and is not included. The general mechanisms involved in ROS generation by a variety of pro-oxidant agents (from natural and synthetic origin) have been discussed extensively elsewhere [42].

Some natural products reported in Table 1 are drugs currently used in cancer chemotherapy (e.g. paclitaxel, vincristine, vinblastine, bleomycin, mitomycin, doxorubicin, idarubicin, aclarubicin and actinomycin D). Others have entered clinical trials for the treatment of specific types of cancer (e.g. curcumin, epigallocatechin-3-gallate, genistein, resveratrol, camptothecin, perillal alcohol, lycopene, phenylethyl isothiocyanate, sulforaphane, apolidin, eicosapentaenoic acid, linoleic acid, ursodeoxycholic acid, vitamin C, vitamin D<sub>2</sub> and vitamin D<sub>3</sub>; see <http://clinicaltrials.gov/>). The chemical structures of these compounds are represented in Fig. (1) and Fig. (2). The anticancer activity of most compounds compiled in Table 1 has only been evaluated in pre-clinical models.

It is important to mention that, although the pro-oxidant effect of a specific natural product may not be the most important cytotoxic mechanism of action, this pro-oxidant effect may be responsible for the selective anticancer activity of the compound. For instance, it is known that the main mechanism of action of paclitaxel consists in the inhibition of microtubule assembly. A drug that only inhibits microtubule assembly would be equally cytotoxic in cells with the same proliferating rate, as microtubules are necessary for cell proliferation. Because it is known that cancer cells are more vulnerable to paclitaxel than highly proliferating non-malignant cells, it has been enigmatic for many years why this drug has certain selectivity for cancer cells [25]. Recently, it was observed that the accumulation of  $H_2O_2$  is crucial for paclitaxel-induced cancer cell death both *in vitro* and *in vivo* [6, 8]. Being well known that  $H_2O_2$  can induce selective killing of cancer cells, it seems possible that paclitaxel-induced  $H_2O_2$  production plays a role in the selective anticancer effects of this natural product.

Since the redox state of the cell is important for many cellular processes, it has been discussed that pro-oxidant agents may act as "dirty" drugs (agents that modulate multiple molecular targets through pleiotropic interactions). However, recent research suggests that this pleiotropic mode of action may be an advantage to overcome cancer cell drug resistance typical of drugs acting on just one target [42]. Although pro-oxidant agents could be used as stand-alone drugs, evidence suggests that they could also be used in combination [42]. Indeed, although ROS induce cancer cell death, tumor cells are known to develop mechanisms that prevent ROS from reaching cytotoxic levels. The glutathione and thioredoxin antioxidant systems are crucial for detoxifying ROS. These antioxidant systems are activated in cancer cells and play an important role in the development of resistance to many anticancer agents [65-71]. The possible drug resistance induced by pro-oxidant agents could be reduced with glycolysis inhibitors [13]. Evidence indicates that pro-oxidant agents can increase the cellular levels of  $H_2O_2$  and that glycolysis inhibitors can reduce the capacity of cells to detoxify  $H_2O_2$ . Experimental data have shown that malignant cells are more susceptible to glucose deprivation than non-transformed cells, and that an increase in the levels of  $H_2O_2$  may mediate the cytotoxic effect induced by glucose deprivation [62, 72-74]. Two possible mechanisms may explain why the activation of glycolysis plays an important function in protecting tumor cells from  $H_2O_2$ -induced cell death. First, the activation of glycolysis increases the formation of pyru-

**Table 1. Natural Products with Pro-Oxidant and Anticancer Activities**

Compound	Type of compound	Natural source	References
Compounds of Primary Metabolism and derivatives			
Abrin	Aminoacid	<i>Abrus precatorius</i> (Fabaceae)	[81, 82]
Ajoene	Organosulfur	<i>Allium sativum</i> (Alliaceae)	[83, 84]
Allicin	Organosulfur	<i>Allium sativum</i> (Alliaceae)	[85-87]
Benzyl isothiocyanate	Organosulfur	<i>Brassica</i> spp. (Brassicaceae)	[88, 89]
Diallyl disulfide	Organosulfur	<i>Allium</i> spp. (Alliaceae)	[90, 91]
Dimethyl disulfide	Organosulfur	<i>Allium</i> spp. (Alliaceae)	[92]
Jasmonic acid	Fatty acid	<i>Jasminum</i> spp. (Oleaceae), widespread	[93]
Linoleic acid	Fatty acid	<i>Carthamus tinctorius</i> (Asteraceae)	[94, 95]
Linolenic acid	Fatty acid	<i>Perilla frutescens</i> (Lamiaceae)	[95-97]
L-Mimosine	Aminoacid	<i>Mimosa</i> spp., <i>Leucaena</i> spp. (Fabaceae)	[98, 99]
Melatonin	Aminoacid	<i>Prunus cerasus</i> (Rosaceae)	[100, 101]
Methyl jasmonate	Fatty acid	<i>Jasminum</i> spp. (Oleaceae), widespread	[93, 102]
Phenylethylisothiocyanate	Organosulfur	<i>Brassica</i> spp. (Brassicaceae)	[89, 103, 104]
Sorbitol	Sugar alcohol	<i>Malus</i> spp. (Rosaceae)	[105]
Sulforaphane	Organosulfur	<i>Brassica</i> spp. (Brassicaceae)	[106, 107]
Phenolic compounds			
2'-Hydroxycinnamaldehyde	Phenolic acid	<i>Cinnamomum</i> spp. (Lauraceae)	[108, 109]
3,7,4'-trihydroxyflavone	Flavone	<i>Rhus chinensis</i> (Anacardiaceae)	[110, 111]
4'-Hydroxycinnamaldehyde	4'-Hydroxycinnamaldehyde	<i>Alpinia galanga</i> (Zingiberaceae)	[112]
4-Hydroxycinnamic acid	Hydroxycinnamic acid	<i>Erythrina fusca</i> (Fabaceae), widespread	[113, 114]
6- Dehydrogingerdione	Aryl alkanones	<i>Zingiber officinale</i> (Zingiberaceae)	[115, 116]
6-Gingerol	Aryl alkanones	<i>Zingiber officinale</i> (Zingiberaceae)	[117, 118]
6-Shogaol	Aryl alkanones	<i>Zingiber officinale</i> (Zingiberaceae)	[119]
8-Shogaol	Aryl alkanones	<i>Zingiber officinale</i> (Zingiberaceae)	[120]
Acacetin	Flavone	<i>Robinia pseudoacacia</i> (Fabaceae)	[121, 122]
Aesculetin	Coumarin	<i>Aesculus hippocastanum</i> (Hippocastanaceae)	[123]
Aloe-emodin	Anthraquinone	<i>Rheum</i> spp. (Polygonaceae), <i>Cassia</i> spp. (Fabaceae)	[124, 125]
Apigenin	Flavone	<i>Petroselinum crispum</i> (Apiaceae), widespread	[126, 127]
Baicalein	Flavone	<i>Scutellaria baicalensis</i> (Lamiaceae), <i>Oroxylum indicum</i> (Bignoniaceae)	[128, 129]
Baicalin	Flavone	<i>Scutellaria</i> spp. (Lamiaceae)	[130, 131]
Benzaldehyde	Aromatic aldehyde	<i>Prunus</i> spp. (Rosaceae), widespread	[132, 133]
Betuletol 3-methyl ether	Flavonol	<i>Allagopappus viscosissimus</i> (Asteraceae)	[134]
Butein	Chalcone	<i>Rhus verniciflua</i> (Anacardiaceae)	[135]
Caffeic acid	Phenolic acid	<i>Coffea</i> spp. (Rubiaceae), widespread	[136, 137]

(Table 1) contd....

Compound	Type of compound	Natural source	References
Cajanol	Isoflavanone	<i>Cajanus cajan</i> (Fabaceae)	[138]
Catechin	Flavan-3-ol	<i>Acacia catechu</i> (Fabaceae), widespread	[139, 140]
Catechol	Simple phenol	<i>Cola</i> spp. (Malvaceae), <i>Gaultheria</i> spp. (Ericaceae)	[141-143]
Chebulinic acid	Hydrolyzable tannin	<i>Terminalia chebula</i> (Combretaceae)	[144, 145]
Chlorogenic acid	Phenolic acid	<i>Coffea</i> spp. (Rubiaceae), widespread	[146-148]
Chrysin	Flavone	<i>Prunus</i> spp. (Rosaceae),	[149-151]
Chrysoeriol	Flavone	<i>Medicago sativa</i> (Fabaceae), widespread	[152]
Chrysophanol	Anthraquinone	<i>Rhamnus</i> spp. (Rhamnaceae), <i>Rheum</i> spp. (Polygonaceae)	[153]
Curcumin	Diarylheptanoid	<i>Curcuma longa</i> (Zingiberaceae)	[39, 154, 155]
Cyanidin	Anthocyanidin	<i>Vaccinium</i> spp. (Ericaceae), <i>Prunus</i> spp. (Rosaceae)	[156, 157]
Cyanidin 3-glucoside	Anthocyanin	<i>Vaccinium</i> spp. (Ericaceae), <i>Prunus</i> spp. (Rosaceae)	[157, 158]
Cyanidin-3-rutinoside	Anthocyanin	<i>Vaccinium</i> spp. (Ericaceae), <i>Prunus</i> spp. (Rosaceae)	[157, 159]
Daidzein	Isoflavone	<i>Glycine max</i> (Fabaceae), widespread	[160]
Dantron	Anthraquinone	<i>Xyris semifuscata</i> (Xyridaceae)	[161, 162]
Daphnetin	Coumarin	<i>Daphne</i> spp. (Thymelaeaceae)	[163]
Delphinidin	Anthocyanidin	<i>Delphinium</i> spp. (Ranunculaceae)	[157, 164]
Delphinidin 3-sambubioside	Anthocyanin	<i>Hibiscus</i> spp. (Malvaceae)	[165]
Diospyrin	Naphthoquinone	<i>Diospyros montana</i> (Ebenaceae)	[166]
Ellagic acid	Phenolic acid	<i>Vaccinium</i> spp. (Ericaceae), widespread	[167]
Emodin	Anthraquinone	<i>Rheum</i> spp. (Polygonaceae)	[168]
Epicatechin	Flavan-3-ol	<i>Acacia catechu</i> (Fabaceae), widespread	[139, 169]
Epicatechin-gallate	Flavan-3-ol	<i>Camellia sinensis</i> (Theaceae)	[170]
Epigallocatechin	Flavan-3-ol	<i>Camellia sinensis</i> (Theaceae)	[170]
Epigallocatechin-3-gallate	Flavan-3-ol	<i>Camellia sinensis</i> (Theaceae)	[170, 171]
Eriodictyol	Flavanone	<i>Eriodictyon californicum</i> (Boraginaceae)	[172]
Esculetin (Aesculetin)	Coumarin	<i>Aesculus hippocastanum</i> (Hippocastanaceae)	[163, 173]
Eugenol	Phenylpropanoid	<i>Eugenia caryophyllata</i> (Myrtaceae)	[174]
Eupafolin	Flavone	<i>Eupatorium perfoliatum</i> (Asteraceae), <i>Artemisia princeps</i> (Asteraceae)	[175-177]
Ferulic acid	Phenolic acid	<i>Ferula communis</i> (Apiaceae), widespread	[136]
Fisetin	Flavonol	<i>Fragaria</i> spp. (Rosaceae), widespread	[178, 179]
Flavokawain B	Chalcone	<i>Piper methysticum</i> (Piperaceae)	[180]
Fraxetin	Coumarin	<i>Fraxinus</i> spp. (Oleaceae)	[173, 181]
Gallic acid	Phenolic acid	<i>Kalanchoe</i> spp. (Crassulaceae), widespread	[182, 183]
Gambogic acid	Xanthone	<i>Garcinia hanburyi</i> (Clusiaceae)	[184, 185]

(Table 1) contd....

Compound	Type of compound	Natural source	References
Genistein	Isoflavone	<i>Genista</i> spp. (Fabaceae), widespread	[186]
Gentiacaulin	Xanthone	<i>Gentiana kochiana</i> (Gentianaceae)	[187]
Gentiakochianin	Xanthone	<i>Gentiana kochiana</i> (Gentianaceae)	[187]
Guttiferone-A	Benzophenone	<i>Garcinia livingstonei</i> (Clusiaceae)	[188]
Hesperetin	Flavanone	<i>Citrus</i> spp. (Rutaceae)	[189, 190]
Hydroxytyrosol	Simple Phenol	<i>Olea europaea</i> (Oleaceae)	[191]
Icariin	Flavonol glycoside	<i>Epimedium</i> spp. (Berberidaceae)	[192]
Isoeugenol	Phenylpropanoid	<i>Eugenia caryophyllata</i> (Myrtaceae)	[193, 194]
Isoliquiritigenin	Chalcone	<i>Glycyrrhiza glabra</i> (Fabaceae)	[178, 195]
Juglone	Naphthoquinone	<i>Juglans regia</i> (Juglandaceae)	[196, 197]
Kaempferol	Flavonol	<i>Kaempferia galanga</i> (Zingiberaceae), widespread	[198, 199]
Liquiritigenin	Flavanone	<i>Glycyrrhiza glabra</i> (Fabaceae)	[200]
Luteolin	Flavone	<i>Reseda luteola</i> (Resedaceae), widespread	[201, 202]
Malvidin	Anthocyanidin	<i>Althaea rosea</i> (Malvaceae)	[157, 203]
Malvidin 3-glucoside	Anthocyanin	<i>Vitis</i> spp. (Vitaceae)	[157, 204]
Methyl gallate	Phenolic acid	<i>Camellia sinensis</i> (Theaceae)	[205]
Morin	Flavone	<i>Maclura</i> spp. (Moraceae)	[206]
Myricetin	Flavonol	<i>Myrica rubra</i> (Myricaceae), widespread	[59, 207]
Naringenin	Flavanone	<i>Citrus</i> spp. (Rutaceae), widespread	[208, 209]
Nordihydroguaiaretic acid	Phenolic acid	<i>Larrea</i> spp. (Zygophyllaceae)	[210-212]
Norwogonin	Flavone	<i>Scutellaria</i> spp. (Lamiaceae)	[213]
Pelargonidin	Anthocyanidin	<i>Pelargonium</i> spp. (Geraniaceae)	[157, 203]
Pelargonidin 3-glucoside	Anthocyanin	<i>Vaccinium</i> spp. (Ericaceae)	[157, 214]
Pentagalloyl glucose	Hydrolyzable tannin	<i>Quercus infectoria</i> (Fagaceae)	[215, 216]
Peonidin	Anthocyanidin	<i>Paeonia</i> spp. (Ranunculaceae)	[157, 203]
Peonidin 3-glucoside	Anthocyanin	<i>Vaccinium</i> spp. (Ericaceae)	[157, 217]
Phloretin	Chalcone	<i>Malus</i> spp. (Rosaceae)	[178, 218]
Plumbagin	Naphthoquinone	<i>Drosera</i> spp. (Droseraceae)	[219, 220]
Procyanidin B2	Proanthocyanidin	<i>Cinnamomum cassia</i> (Lauraceae), <i>Vaccinium</i> spp. (Ericaceae)	[221, 222]
Protoapigenone	Flavone	<i>Thelypteris torresiana</i> (Thelypteridaceae)	[223]
Psoralen	Furanocoumarin	<i>Psoralea corylifolia</i> (Fabaceae)	[224, 225]
Pterostilbene	Stilbenoid	<i>Vitis</i> spp. (Vitaceae)	[226]
Quercetin	Flavonol	<i>Citrus</i> spp. (Rutaceae), widespread	[207]
Resveratrol	Stilbenoid	<i>Vitis</i> spp. (Vitaceae)	[227, 228]
Rhein	Anthraquinone	<i>Rheum</i> spp. (Polygonaceae)	[229, 230]
Rosmarinic acid	Hydroxycinnamic acid	<i>Rosmarinus officinalis</i> (Lamiaceae), widespread	[231, 232]



(Table 1) contd....

Compound	Type of compound	Natural source	References
Rottlerin	Phloroglucinol	<i>Mallotus philippinensis</i> (Euphorbiaceae)	[233, 234]
Rutin	Flavonol	<i>Ruta</i> spp. (Rutaceae), widespread	[235-238]
Salicylic acid	Phenolic acid	<i>Salix</i> spp. (Salicaceae)	[239-241]
Shikonin	Naphthoquinone	<i>Lithospermum erythrorhizon</i> (Boraginaceae)	[242, 243]
Sinapic acid	Phenolic acid	<i>Brassica</i> spp. (Brassicaceae), widespread	[113, 114]
Sophoranone	Flavanone	<i>Sophora subprostrata</i> (Fabaceae)	[244]
Tannic acid	Tannin	<i>Quercus</i> spp. (Fagaceae), widespread	[245, 246]
Taxifolin	Flavanonol	<i>Silybum marianum</i> (Asteraceae)	[111, 149, 247]
Tricetin	Flavone	<i>Oryza sativa</i> (Poaceae)	[248]
Usnic acid	Dibenzofuran	<i>Usnea</i> spp. (Parmeliaceae)	[249, 250]
Vanillin	Phenolic acid	<i>Vanilla</i> spp. (Orchidaceae)	[251-253]
Wogonin	Flavone	<i>Scutellaria baicalensis</i> (Lamiaceae)	[254, 255]
Xanthohumol	Chalcone	<i>Humulus lupulus</i> (Cannabaceae)	[256, 257]
Xanthotoxin	Furanocoumarin	<i>Ammi majus</i> (Apiaceae)	[258, 259]
Terpenoids			
18 $\beta$ -Glycyrrhetic acid	Triterpenoid	<i>Glycyrrhiza glabra</i> (Fabaceae)	[260, 261]
Andrographolide	Diterpenoid	<i>Andrographis paniculata</i> (Acanthaceae)	[262]
Artemisinin	Lactone sesquiterpenoid	<i>Artemisia annua</i> (Asteraceae)	[263-265]
Asiatic acid	Triterpenoid	<i>Centella asiatica</i> (Mackinlayaceae)	[266]
Astilbotriterpenic acid	Triterpenoid	<i>Astilbe chinensis</i> (Saxifragaceae)	[267]
Betulinic acid	Triterpenoid	<i>Betula</i> spp. (Betulaceae)	[268]
Bixin	Apocarotenoid	<i>Bixa orellana</i> (Bixaceae)	[269]
Bufalin	Cardiac glycoside	<i>Bufo bufo</i> (Bufonidae)	[270]
Cannabidiol	Cannabinoid	<i>Cannabis sativa</i> (Cannabaceae)	[271-273]
Costunolide	Sesquiterpenoid	<i>Laurus nobilis</i> (Lauraceae)	[274, 275]
Cucurbitacin B	Triterpenoid	<i>Iberis amara</i> (Brassicaceae)	[276]
Dioscin	Steroidal saponin	<i>Dioscorea</i> spp. (Dioscoreaceae)	[277]
Diosgenin	Steroidal sapogenin	<i>Dioscorea</i> spp. (Dioscoreaceae)	[278]
Erythrodiol	Triterpenoid	<i>Olea europaea</i> (Oleaceae)	[279, 280]
Farnesol	Sesquiterpenoid	<i>Vachellia farnesiana</i> (Fabaceae), widespread	[281-283]
Ginkgolide B	Diterpenoid	<i>Ginkgo biloba</i> (Ginkgoaceae)	[284, 285]
Ginsenoside RH-2	Triterpenoid saponin	<i>Ginkgo biloba</i> (Ginkgoaceae)	[286, 287]
Glaucoalyxin A	Diterpenoid	<i>Rabdosia japonica</i> var. <i>glaucoalyxin</i> (Lamiaceae)	[288]
Guggulsterone	Triterpenoid	<i>Commiphora mukul</i> (Burseraceae)	[289, 290]
Gypenosides	Triterpenoid	<i>Gynostemma pentaphyllum</i> (Cucurbitaceae)	[291, 292]
Helenalin	Sesquiterpenoid	<i>Arnica</i> spp. (Asteraceae)	[293]
Linalool	Monoterpenoid	<i>Coriandrum sativum</i> (Apiaceae), widespread	[294]

(Table 1) contd....

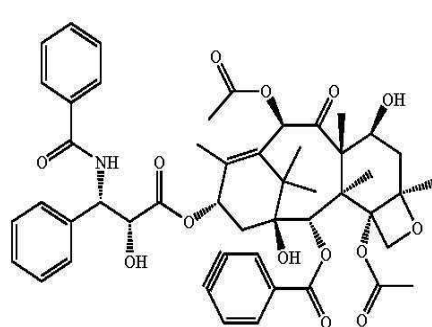
Compound	Type of compound	Natural source	References
Lupeol	Triterpenoid	<i>Mangifera</i> spp. (Anacardiaceae), widespread	[295]
Lycopene	Carotenoid	<i>Solanum lycopersicum</i> (Solanaceae)	[296-298]
Oleandrin	Cardiac glycoside	<i>Nerium oleander</i> (Apocynaceae)	[299]
Oleanolic acid	Triterpenoid	<i>Olea europaea</i> (Oleaceae), widespread	[300, 301]
Oleuropein	Iridoid	<i>Olea europaea</i> (Oleaceae)	[302-304]
Oridonin	Diterpenoid	<i>Rabdosia rubescens</i> (Lamiaceae)	[305]
Ouabain	Cardiac glycoside	<i>Strophanthus gratus</i> , <i>S. kombe</i> (Apocynaceae)	[306]
Ovatodiolide	Diterpenoid	<i>Anisomeles indica</i> (Lamiaceae)	[307]
Taxol	Diterpenoid	<i>Taxus brevifolia</i> (Taxaceae)	[6, 308, 309]
Parthenolide	Sesquiterpenoid	<i>Chrysanthemum parthenium</i> (Asteraceae)	[310, 311]
Perillyl alcohol	Monoterpenoid	<i>Perilla frutescens</i> (Lamiaceae) (Lamiaceae)	[312, 313]
Polygodial	Sesquiterpenoid	<i>Tasmannia</i> spp. (Winteraceae)	[314, 315]
Pristimerin	Triterpenoid	<i>Maytenus heterophylla</i> (Celastraceae)	[316, 317]
Protopanaxadiol	Triterpenoid saponin	<i>Panax ginseng</i> (Araliaceae)	[318, 319]
Sarsasapogenin	Steroidal sapogenin	<i>Smilax</i> spp. (Smilacaceae)	[320]
Tetrahydrocannabinol	Cannabinoid	<i>Cannabis sativa</i> (Cannabaceae)	[321]
Thymol	Monoterpenoid	<i>Thymus</i> spp. (Lamiaceae), widespread	[322]
Triptolide	Diterpenoid	<i>Tripterygium wilfordii</i> (Celastraceae)	[323, 324]
Ursolic acid	Triterpenoid	<i>Arctostaphylos uva-ursi</i> (Ericaceae), widespread	[325]
Uvaol	Triterpenoid	<i>Olea europaea</i> (Oleaceae)	[280]
Withaferin	Withasteroid	<i>Withania somnifera</i> (Solanaceae)	[326, 327]
$\alpha$ -Hederin	Triterpenoid saponin	<i>Hedera helix</i> (Araliaceae)	[328]
$\alpha$ -humulene	Sesquiterpenoid	<i>Humulus lupulus</i> (Cannabaceae)	[329]
$\beta$ -Amyrin	Triterpenoid	<i>Medicago sativa</i> (Fabaceae), widespread	[330]
$\beta$ -carotene	Carotenoid	<i>Daucus carota</i> (Apiaceae), widespread	[331-333]
$\beta$ -Escin (aescin)	Triterpenoid saponin	<i>Aesculus hippocastanum</i> (Hippocastanaceae)	[334]
Atractyloside	Diterpenoid	<i>Atractylis</i> spp. (Asteraceae)	[335, 336]
$\beta$ -Sitosterol	Phytosterol	<i>Serenoa repens</i> (Arecaceae), widespread	[337]
Vernolepin	Lactone sesquiterpenoid	<i>Vernonia hymenolepis</i> (Compositae)	[338]
Alkaloids			
6-Methoxydihydrosanguinarine	Benzophenanthridine	<i>Hylomecon hylomeconoides</i> (Papaveraceae)	[339, 340]
Berberine	Isoquinoline	<i>Berberis</i> spp. (Berberidaceae)	[341, 342]
Boldine	Aporphine	<i>Peumus boldus</i> (Monimiaceae)	[343, 344]
Caffeine	Xanthine	<i>Coffea</i> spp. (Rubiaceae), <i>Camellia sinensis</i> (Theaceae)	[345-347]
Camptothecin	Quinoline	<i>Camptotheca acuminata</i> (Nyssaceae)	[7, 348]
Cepharanthine	Isoquinoline	<i>Stephania cepharantha</i> (Menispermaceae)	[349, 350]

(Table 1) contd....

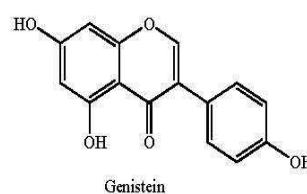
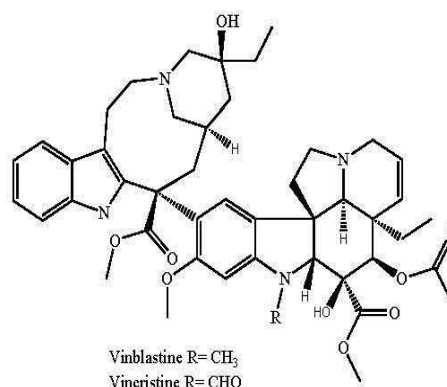
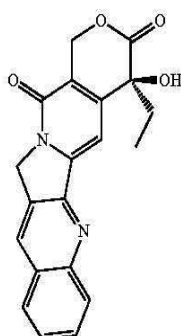
Compound	Type of compound	Natural source	References
Chelerythrine	Phenanthridine	<i>Chelidonium majus</i> (Papaveraceae)	[351-353]
Ellipticine	Pyridocarbazole	<i>Ochrosia elliptica</i> (Apocynaceae)	[354-356]
Homoharringtonine	Cephalotaxine	<i>Cephalotaxus harringtonia</i> (Cephalotaxaceae)	[357]
Indole acetic acid	Indole	<i>Arabidopsis thaliana</i> (Brassicaceae)	[358, 359]
Indole-3-carbinol	Indole	<i>Brassica</i> spp. (Brassicaceae)	[360]
Lycopodine	Quinolizidine	<i>Lycopodium clavatum</i> (Lycopodiaceae)	[361]
Morphine	Phenanthrene	<i>Papaver somniferum</i> (Papaveraceae)	[362, 363]
Oxymatrine	Quinolizidine	<i>Sophora flavescens</i> (Fabaceae)	[364]
Pancratistatin	Phenanthridine	<i>Hymenocallis</i> spp. (Amaryllidaceae)	[365, 366]
Piperine	Piperidine	<i>Piper</i> spp. (Piperaceae)	[367, 368]
Sampangine	Aporphine	<i>Cananga odorata</i> (Annonaceae)	[369]
Sanguinarine	Benzylisoquinoline	<i>Sanguinaria canadensis</i> (Papaveraceae)	[353, 370]
Tetrandrine	Bis-benzylisoquinoline	<i>Stephania tetrandra</i> (Menispermaceae)	[371, 372]
Tomatine	Steroidal	<i>Solanum lycopersicum</i> (Solanaceae)	[373, 374]
Vinblastine	Bis-indole	<i>Catharanthus roseus</i> (Apocynaceae)	[375, 376]
Vincristine	Bis-indole	<i>Catharanthus roseus</i> (Apocynaceae)	[377, 378]
Other natural products			
4-Acetyl-12,13-epoxyl-9-trichothecene-3,15-diol	Macrocyclic Trichocenes	<i>Isaria japonica</i> (Onygenaceae)	[379]
Aclarubicin	anthracycline	<i>Streptomyces galilaensis</i> (Streptomycetaceae)	[380]
Actinomycin-D	Polypeptide	<i>Streptomyces</i> spp. (Streptomycetaceae)	[381, 382]
Aplidin	Depsipeptide	<i>Aplidium albicans</i> (Clavelinidae)	[383-385]
Arachidonic acid	Fatty acid	Widespread in vertebrates	[96, 386, 387]
Ascididemin	Pyridoacridine	<i>Cystodytes dellechiaiei</i> (Polycitoridae)	[388, 389]
Bleomycin	Glucopeptide	<i>Streptomyces verticillus</i> (Streptomycetaceae)	[390, 391]
Boningmycin	Glucopeptide	<i>Streptomyces verticillus</i> var. <i>pingyangensis</i> (Streptomycetaceae)	[392]
Butenolide	Lactone	<i>Angelica</i> spp. (Apiaceae)	[393]
Capsaicin	Capsaicinoid	<i>Capsicum</i> spp. (Solanaceae)	[394, 395]
Chenodeoxycholic acid	Bile acid	Liver of animals	[396-398]
Cholic acid	Bile acid	Liver of animals	[399, 400]
C-phycocyanin	Phycobiliprotein	<i>Aphanizomenon flos-aquae</i> (Nostocaceae)	[401]
Cribrostatin 6	Quinone	<i>Cribrochalina</i> spp. (Haliclونidae)	[402]
Daunomycin	anthracycline	<i>Streptomyces peucetius</i> (Streptomycetaceae)	[403]
Deoxycholic acid	Bile acid	Liver of animals	[397, 398, 404]
Deoxynivalenol (Vomitoxin)	Epoxy-sesquiterpenoid	<i>Fusarium</i> spp. (Nectriaceae)	[405, 406]
Docosahexaenoic acid (DHA)	Fatty acid	<i>Cryptocodinium cohnii</i> , <i>Schizochytrium</i> spp.	[407]

(Table 1) contd....

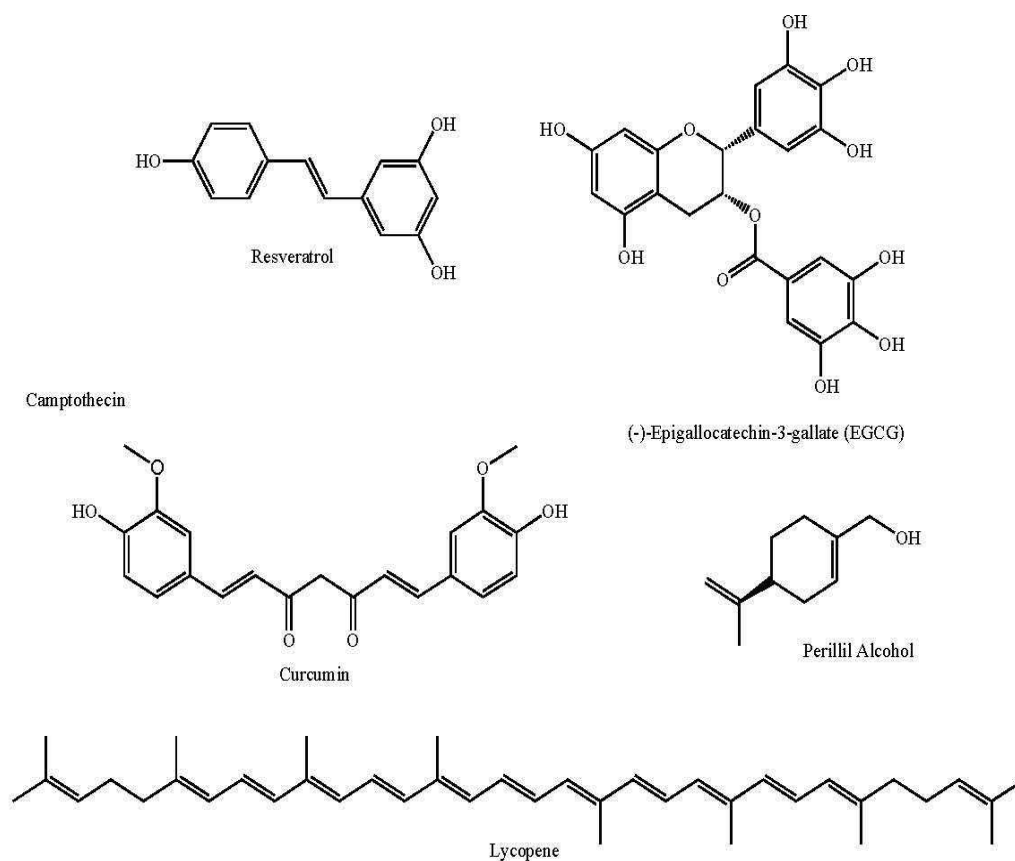
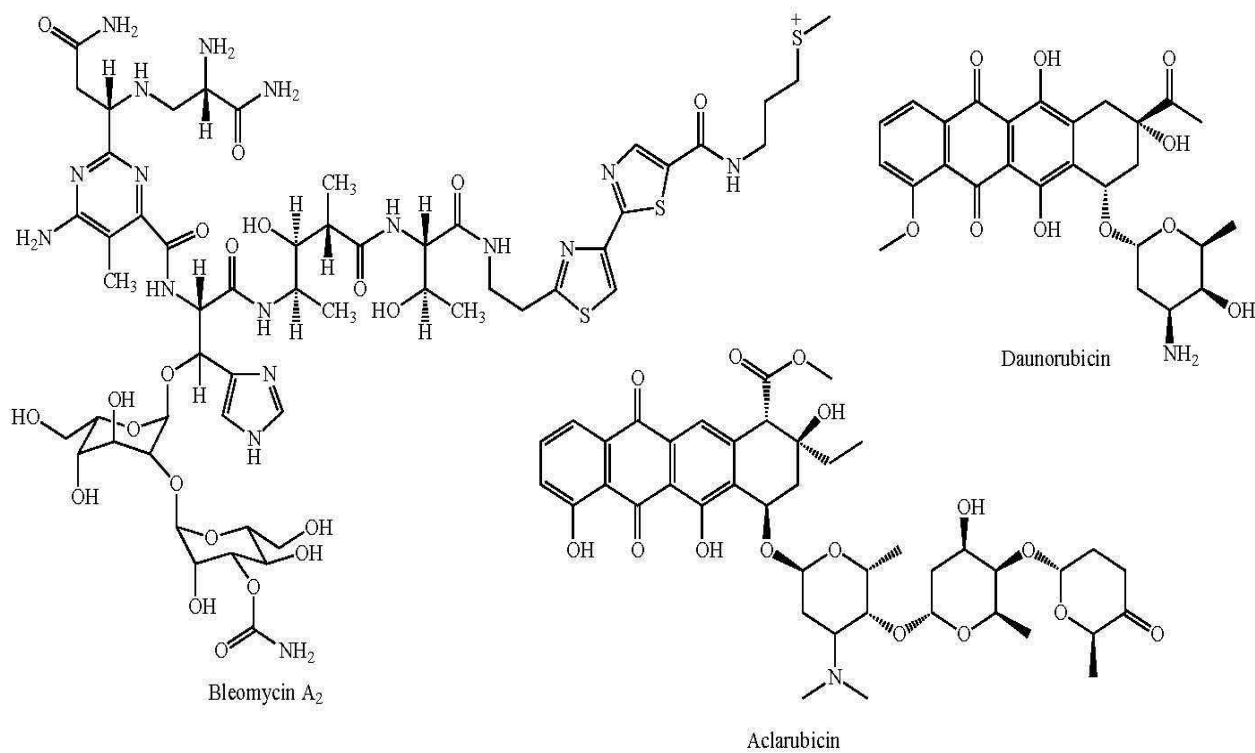
Compound	Type of compound	Natural source	References
Doxorubicin	Anthracycline	<i>Streptomyces</i> spp. (Streptomycetaceae)	[377, 408, 409]
Eicosapentaenoic acid (EPA)	Fatty acid	<i>Cryptocodinium cohnii</i> , <i>Parietochloris incise</i>	[96, 410, 411]
F-2 Mycotoxin (Zearalenone)	Trichothecene	<i>Gibberella</i> spp. (Nectriaceae)	[412, 413]
Fucoxanthin	Carotenoid	<i>Undaria pinnatifida</i> (Alariaceae)	[414]
Isoobtusilactone A	Butanolide	<i>Cinnamomum kotoense</i> (Lauraceae)	[415, 416]
Kotomolide A	Butyrolactone	<i>Cinnamomum kotoense</i> (Lauraceae)	[417]
Mitomycin C	Aziridine	<i>Streptomyces caespitosus</i> (Streptomycetaceae)	[418-420]
Neocarzinostatin	chromoprotein enediyne	<i>Streptomyces carzinostaticus</i> (Streptomycetaceae)	[421]
Norharman	$\beta$ -carboline alkaloid	<i>Passiflora incarnata</i> (Passifloraceae)	[422, 423]
Ochratoxin A	Pentaketide	<i>Aspergillus ochraceus</i> (Trichocomaceae)	[424-426]
Patulin	Fuopyranone	<i>Penicillium</i> spp. (Trichocomaceae)	[427-429]
Putrescine-1,4-dicinnamide	Phenylpropanoid	<i>Pholiota spumosa</i> (Strophariaceae)	[430]
Secotenuifolide	Butanolide	<i>Cinnamomum tenuifolium</i> (Lauraceae)	[431]
T-2 mycotoxin	Trichothecene	<i>Fusarium</i> spp. (Nectriaceae)	[432, 433]
Ursodeoxycholic acid	Bile acid	Liver of animals	[434]
Vitamin A (retinol)	Carotenoid	<i>Daucus carota</i> (Apiaceae)	[435-437]
Vitamin C (Ascorbic acid)	Butenolide	<i>Citrus</i> spp. (Rutaceae), widespread	[56, 438, 439]
Vitamin D2 (Ergocalciferol)	Steroid	<i>Lentinus edodes</i> (Marasmiaceae)	[440]
Vitamin D3 (Cholecalciferol)	Steroid	Animal origin	[441, 442]
Vitamin K2	Naftoquinone	<i>Brassica</i> spp. (Brassicaceae), widespread	[443, 444]
Vitamin K3	Naftoquinone	<i>Brassica</i> spp. (Brassicaceae), widespread	[445, 446]



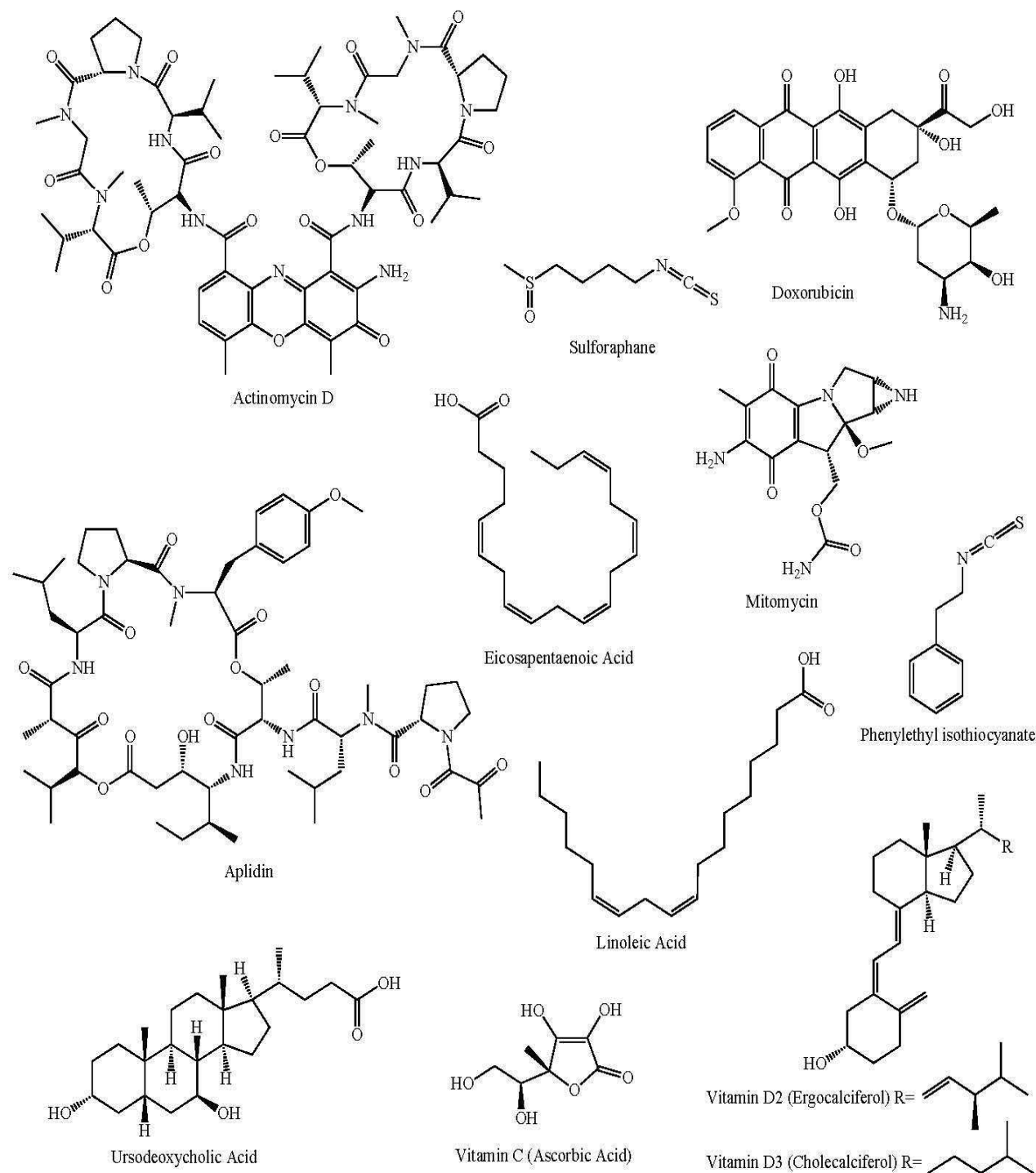
Taxol



(Fig. 1) contd...

**Fig. (1).** Selected plant secondary metabolites with pro-oxidant and anticancer activities.

(Fig. 2) contd...

**Fig. (2).** Selected natural products, excluding plant secondary metabolites, with pro-oxidant and anticancer activities.

vate, which is an efficient scavenger of  $\text{H}_2\text{O}_2$  [75-78]. Second, glucose metabolism through the pentose phosphate pathway regenerates NADPH from  $\text{NADP}^+$  in a reaction in which glucose-6-phosphate is converted into 6-phosphogluconolactone by the enzyme glucose-6-phosphate dehydrogenase. The regeneration of NADPH is required for  $\text{H}_2\text{O}_2$  detoxification through the glutathione peroxidase/glutathione reductase system and through the thioredoxin peroxidase/thioredoxin reductase system [73, 79, 80] (reviewed in [13]). Therefore, the anticancer potential of pro-

oxidant natural products could be maximize in combination with glycolysis inhibitors.

In conclusion, natural products have made a significant contribution to the development of many anticancer drugs currently used in chemotherapy. Recent observations suggest that pro-oxidant agents may represent a new class of anticancer drugs with capacity to target tumor cells selectively. In this article, we have provided an overview of pro-oxidant natural products with anticancer activity and discussed their anticancer potential.



## CONFLICT OF INTEREST

Declared none.

## ACKNOWLEDGEMENT

Declared none.

## REFERENCES

- [1] Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 2011; 61: 69-90.
- [2] Jemal A, Siegel R, Xu J, Ward E. Cancer statistics, 2010. *CA Cancer J Clin* 2010; 60: 277-300.
- [3] Newman DJ, Cragg GM. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. *J Nat Prod* 2007; 70: 461-77.
- [4] Cragg GM, Grothaus PG, Newman DJ. Impact of natural products on developing new anti-cancer agents. *Chem Rev* 2009; 109: 3012-43.
- [5] Cragg GM, Newman DJ. Plants as a source of anti-cancer agents. *J Ethnopharmacol* 2005; 100: 72-9.
- [6] Alexandre J, Batteux F, Nicco C, *et al.* Accumulation of hydrogen peroxide is an early and crucial step for paclitaxel-induced cancer cell death both *in vitro* and *in vivo*. *Int J Cancer* 2006; 119: 41-8.
- [7] Gorman A, McGowan A, Cotter TG. Role of peroxide and superoxide anion during tumour cell apoptosis. *FEBS Lett* 1997; 404: 27-33.
- [8] Alexandre J, Hu Y, Lu W, Pelicano H, Huang P. Novel action of paclitaxel against cancer cells: bystander effect mediated by reactive oxygen species. *Cancer Res* 2007; 67: 3512-7.
- [9] Pelicano H, Carney D, Huang P. ROS stress in cancer cells and therapeutic implications. *Drug Resist Updat* 2004; 7: 97-110.
- [10] Renschler MF. The emerging role of reactive oxygen species in cancer therapy. *Eur J Cancer* 2004; 40: 1934-40.
- [11] Schumacker PT. Reactive oxygen species in cancer cells: live by the sword, die by the sword. *Cancer Cell* 2006; 10: 175-6.
- [12] Lopez-Lazaro M. Dual role of hydrogen peroxide in cancer: Possible relevance to cancer chemoprevention and therapy. *Cancer Lett* 2007; 252: 1-8.
- [13] Lopez-Lazaro M. A new view of carcinogenesis and an alternative approach to cancer therapy. *Mol Med* 2010; 16: 144-53.
- [14] Halliwell B. Free radicals and antioxidants - quo vadis? *Trends Pharmacol Sci* 2011; 32: 125-30.
- [15] Droge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev* 2002; 82: 47-95.
- [16] Balaban RS, Nemoto S, Finkel T. Mitochondria, oxidants, and aging. *Cell* 2005; 120: 483-95.
- [17] Szatrowski TP, Nathan CF. Production of large amounts of hydrogen peroxide by human tumor cells. *Cancer Res* 1991; 51: 794-8.
- [18] Halliwell B. Oxidative stress and cancer: have we moved forward? *Biochem J* 2007; 401: 1-11.
- [19] Kovacic P, Jacintho JD. Mechanisms of carcinogenesis: focus on oxidative stress and electron transfer. *Curr Med Chem* 2001; 8: 773-96.
- [20] Lopez-Lazaro M. Role of oxygen in cancer: looking beyond hypoxia. *Anticancer Agents Med Chem* 2009; 9: 517-25.
- [21] Lopez-Lazaro M. Excessive superoxide anion generation plays a key role in carcinogenesis. *Int J Cancer* 2007; 120: 1378-80.
- [22] Okamoto M, Kawai K, Reznikoff CA, Oyasu R. Transformation *in vitro* of a nontumorigenic rat urothelial cell line by hydrogen peroxide. *Cancer Res* 1996; 56: 4649-53.
- [23] Suh YA, Arnold RS, Lassegue B, *et al.* Cell transformation by the superoxide-generating oxidase Mox1. *Nature* 1999; 401: 79-82.
- [24] Arnold RS, Shi J, Murad E, *et al.* Hydrogen peroxide mediates the cell growth and transformation caused by the mitogenic oxidase Nox1. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98: 5550-5.
- [25] Vogelstein B, Kinzler KW. Cancer genes and the pathways they control. *Nat Med* 2004; 10: 789-99.
- [26] Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000; 100: 57-70.
- [27] Hahn WC, Weinberg RA. Rules for making human tumor cells. *N Engl J Med* 2002; 347: 1593-603.
- [28] Park S, You X, Imlay JA. Substantial DNA damage from submicromolar intracellular hydrogen peroxide detected in Hpx- mutants of *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102: 9317-22.
- [29] Henle ES, Linn S. Formation, prevention, and repair of DNA damage by iron/hydrogen peroxide. *J Biol Chem* 1997; 272: 19095-8.
- [30] Hunt CR, Sim JE, Sullivan SJ, *et al.* Genomic instability and catalase gene amplification induced by chronic exposure to oxidative stress. *Cancer Res* 1998; 58: 3986-92.
- [31] Burdon RH. Superoxide and hydrogen peroxide in relation to mammalian cell proliferation. *Free Radic Biol Med* 1995; 18: 775-94.
- [32] Brown MR, Miller FJ, Jr., Li WG, *et al.* Overexpression of human catalase inhibits proliferation and promotes apoptosis in vascular smooth muscle cells. *Circ Res* 1999; 85: 524-33.
- [33] del Bello B, Paolicchi A, Comporti M, Pompella A, Maellaro E. Hydrogen peroxide produced during gamma-glutamyl transpeptidase activity is involved in prevention of apoptosis and maintenance of proliferation in U937 cells. *FASEB J* 1999; 13: 69-79.
- [34] Qian Y, Luo J, Leonard SS, *et al.* Hydrogen peroxide formation and actin filament reorganization by Cdc42 are essential for ethanol-induced *in vitro* angiogenesis. *J Biol Chem* 2003; 278: 16189-97.
- [35] Arbiser JL, Petros J, Klafter R, *et al.* Reactive oxygen generated by Nox1 triggers the angiogenic switch. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99: 715-20.
- [36] Polytarchou C, Hatziaepostolou M, Papadimitriou E. Hydrogen peroxide stimulates proliferation and migration of human prostate cancer cells through activation of activator protein-1 and up-regulation of the heparin affinity regulatory peptide gene. *J Biol Chem* 2005; 280: 40428-35.
- [37] Nelson KK, Ranganathan AC, Mansouri J, *et al.* Elevated sod2 activity augments matrix metalloproteinase expression: evidence for the involvement of endogenous hydrogen peroxide in regulating metastasis. *Clin Cancer Res* 2003; 9: 424-32.
- [38] Nishikawa M, Tamada A, Hyoudou K, *et al.* Inhibition of experimental hepatic metastasis by targeted delivery of catalase in mice. *Clin Exp Metastasis* 2004; 21: 213-21.
- [39] Lopez-Lazaro M. Anticancer and carcinogenic properties of curcumin: considerations for its clinical development as a cancer chemopreventive and chemotherapeutic agent. *Mol Nutr Food Res* 2008; 52 Suppl 1: S103-27; S103-S127.
- [40] Fang J, Nakamura H, Iyer AK. Tumor-targeted induction of oxidative stress for cancer therapy. *J Drug Target* 2007; 15: 475-86.
- [41] Fruehauf JP, Meyskens FL, Jr. Reactive oxygen species: a breath of life or death? *Clin Cancer Res* 2007; 13: 789-94.
- [42] Wondrak GT. Redox-directed cancer therapeutics: molecular mechanisms and opportunities. *Antioxid Redox Signal* 2009; 11: 3013-69.
- [43] Engel RH, Evens AM. Oxidative stress and apoptosis: a new treatment paradigm in cancer. *Front Biosci* 2006; 11: 300-12.
- [44] Alexandre J, Nicco C, Chereau C, *et al.* Improvement of the therapeutic index of anticancer drugs by the superoxide dismutase mimic mangafodipir. *J Natl Cancer Inst* 2006; 98: 236-44.
- [45] Jing Y, Dai J, Chalmers-Redman RM, Tatton WG, Waxman S. Arsenic trioxide selectively induces acute promyelocytic leukemia cell apoptosis via a hydrogen peroxide-dependent pathway. *Blood* 1999; 94: 2102-11.
- [46] Mizutani H, Tada-Oikawa S, Hiraku Y, Kojima M, Kawanishi S. Mechanism of apoptosis induced by doxorubicin through the generation of hydrogen peroxide. *Life Sci* 2005; 76: 1439-53.
- [47] Ubezio P, Civoli F. Flow cytometric detection of hydrogen peroxide production induced by doxorubicin in cancer cells. *Free Radic Biol Med* 1994; 16: 509-16.
- [48] Ikeda K, Kajiwaru K, Tanabe E, *et al.* Involvement of hydrogen peroxide and hydroxyl radical in chemically induced apoptosis of HL-60 cells. *Biochem Pharmacol* 1999; 57: 1361-5.
- [49] Simizu S, Takada M, Umezawa K, Imoto M. Requirement of caspase-3(-like) protease-mediated hydrogen peroxide production for apoptosis induced by various anticancer drugs. *J Biol Chem* 1998; 273: 26900-7.
- [50] Ling YH, Liebes L, Zou Y, Perez-Soler R. Reactive oxygen species generation and mitochondrial dysfunction in the apoptotic response to Bortezomib, a novel proteasome inhibitor, in human H460 non-small cell lung cancer cells. *J Biol Chem* 2003; 278: 33714-23.



- [51] Perez-Galan P, Roue G, Villamor N, Montserrat E, Campo E, Colomer D. The proteasome inhibitor bortezomib induces apoptosis in mantle-cell lymphoma through generation of ROS and Noxa activation independent of p53 status. *Blood* 2006; 107: 257-64.
- [52] Oh SY, Sohn YW, Park JW, *et al.* Selective cell death of oncogenic Akt-transduced brain cancer cells by etoposide through reactive oxygen species mediated damage. *Mol Cancer Ther* 2007; 6: 2178-87.
- [53] Doroshow JH. Role of hydrogen peroxide and hydroxyl radical formation in the killing of Ehrlich tumor cells by anticancer quinones. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; 83: 4514-8.
- [54] Geng CX, Zeng ZC, Wang JY. Docetaxel inhibits SMMC-7721 human hepatocellular carcinoma cells growth and induces apoptosis. *World J Gastroenterol* 2003; 9: 696-700.
- [55] Hirpara JL, Clement MV, Pervaiz S. Intracellular acidification triggered by mitochondrial-derived hydrogen peroxide is an effector mechanism for drug-induced apoptosis in tumor cells. *J Biol Chem* 2001; 276: 514-21.
- [56] Chen Q, Espey MG, Krishna MC, *et al.* Pharmacologic ascorbic acid concentrations selectively kill cancer cells: action as a pro-drug to deliver hydrogen peroxide to tissues. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102: 13604-9.
- [57] Maeda H, Hori S, Ohizumi H, *et al.* Effective treatment of advanced solid tumors by the combination of arsenic trioxide and L-buthionine-sulfoximine. *Cell Death Differ* 2004; 11: 737-46.
- [58] Djavaheri-Mergny M, Wietzerbin J, Besancon F. 2-Methoxyestradiol induces apoptosis in Ewing sarcoma cells through mitochondrial hydrogen peroxide production. *Oncogene* 2003; 22: 2558-67.
- [59] Lopez-Lazaro M, Calderon-Montano JM, Burgos-Moron E, Austin CA. Green tea constituents (-)-epigallocatechin-3-gallate (EGCG) and gallic acid induce topoisomerase I- and topoisomerase II-DNA complexes in cells mediated by pyrogallol-induced hydrogen peroxide. *Mutagenesis* 2011; 26: 489-98.
- [60] Zieba M, Suwalski M, Kwiatkowska S, *et al.* Comparison of hydrogen peroxide generation and the content of lipid peroxidation products in lung cancer tissue and pulmonary parenchyma. *Respir Med* 2000; 94: 800-5.
- [61] Lim SD, Sun C, Lambeth JD, *et al.* Increased Nox1 and hydrogen peroxide in prostate cancer. *Prostate* 2005; 62: 200-7.
- [62] Aykin-Burns N, Ahmad IM, Zhu Y, Oberley LW, Spitz DR. Increased levels of superoxide and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mediate the differential susceptibility of cancer cells versus normal cells to glucose deprivation. *Biochem J* 2009; 418: 29-37.
- [63] Helleday T, Petermann E, Lundin C, Hodgson B, Sharma RA. DNA repair pathways as targets for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 2008; 8: 193-204.
- [64] Hadi SM, Bhat SH, Azmi AS, Hanif S, Shamim U, Ullah MF. Oxidative breakage of cellular DNA by plant polyphenols: a putative mechanism for anticancer properties. *Semin Cancer Biol* 2007; 17: 370-6.
- [65] Estrela JM, Ortega A, Obrador E. Glutathione in cancer biology and therapy. *Crit Rev Clin Lab Sci* 2006; 43: 143-81.
- [66] Tew KD. Glutathione-associated enzymes in anticancer drug resistance. *Cancer Res* 1994; 54: 4313-20.
- [67] Yang P, Ebbert JO, Sun Z, Weinshilboum RM. Role of the glutathione metabolic pathway in lung cancer treatment and prognosis: a review. *J Clin Oncol* 2006; 24: 1761-9.
- [68] Zhang K, Mack P, Wong KP. Glutathione-related mechanisms in cellular resistance to anticancer drugs. *Int J Oncol* 1998; 12: 871-82.
- [69] Amer ES, Holmgren A. The thioredoxin system in cancer. *Semin Cancer Biol* 2006; 16: 420-6.
- [70] Nonn L, Berggren M, Powis G. Increased expression of mitochondrial peroxiredoxin-3 (thioredoxin peroxidase-2) protects cancer cells against hypoxia and drug-induced hydrogen peroxide-dependent apoptosis. *Mol Cancer Res* 2003; 1: 682-9.
- [71] Powis G, Mustacich D, Coon A. The role of the redox protein thioredoxin in cell growth and cancer. *Free Radic Biol Med* 2000; 29: 312-22.
- [72] Spitz DR, Sim JE, Ridnour LA, Galoforo SS, Lee YJ. Glucose deprivation-induced oxidative stress in human tumor cells. A fundamental defect in metabolism? *Ann N Y Acad Sci* 2000; 899: 349-62.
- [73] Ahmad IM, Aykin-Burns N, Sim JE, *et al.* Mitochondrial O<sub>2</sub><sup>•-</sup> and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mediate glucose deprivation-induced stress in human cancer cells. *J Biol Chem* 2005; 280: 4254-63.
- [74] Jelluma N, Yang X, Stokoe D, Evan GI, Dansen TB, Haas-Kogan DA. Glucose withdrawal induces oxidative stress followed by apoptosis in glioblastoma cells but not in normal human astrocytes. *Mol Cancer Res* 2006; 4: 319-30.
- [75] Nath KA, Ngo EO, Hebbel RP, Croatt AJ, Zhou B, Nutter LM. alpha-Ketoacids scavenge H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> *in vitro* and *in vivo* and reduce menadione-induced DNA injury and cytotoxicity. *Am J Physiol* 1995; 268: C227-C236.
- [76] Miwa H, Fujii J, Kanno H, Taniguchi N, Aozasa K. Pyruvate secreted by human lymphoid cell lines protects cells from hydrogen peroxide mediated cell death. *Free Radic Res* 2000; 33: 45-56.
- [77] Ramakrishnan N, Chen R, McClain DE, Bunger R. Pyruvate prevents hydrogen peroxide-induced apoptosis. *Free Radic Res* 1998; 29: 283-95.
- [78] Salahudeen AK, Clark EC, Nath KA. Hydrogen peroxide-induced renal injury. A protective role for pyruvate *in vitro* and *in vivo*. *J Clin Invest* 1991; 88: 1886-93.
- [79] Tuttle SW, Varnes ME, Mitchell JB, Biaglow JE. Sensitivity to chemical oxidants and radiation in CHO cell lines deficient in oxidative pentose cycle activity. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1992; 22: 671-5.
- [80] Averill-Bates DA, Przybytkowski E. The role of glucose in cellular defences against cytotoxicity of hydrogen peroxide in Chinese hamster ovary cells. *Arch Biochem Biophys* 1994; 312: 52-8.
- [81] Shih SF, Wu YH, Hung CH, Yang HY, Lin JY. Abrin triggers cell death by inactivating a thiol-specific antioxidant protein. *J Biol Chem* 2001; 276: 21870-7.
- [82] Bhaskar AS, Deb U, Kumar O, Lakshmana Rao PV. Abrin induced oxidative stress mediated DNA damage in human leukemic cells and its reversal by N-acetylcysteine. *Toxicol In vitro* 2008; 22: 1902-8.
- [83] Dirsch VM, Gerbes AL, Vollmar AM. Ajoene, a compound of garlic, induces apoptosis in human promyeloleukemic cells, accompanied by generation of reactive oxygen species and activation of nuclear factor kappaB. *Mol Pharmacol* 1998; 53: 402-7.
- [84] Li M, Min JM, Cui JR, *et al.* Z-ajoene induces apoptosis of HL-60 cells: involvement of Bcl-2 cleavage. *Nutr Cancer* 2002; 42: 241-7.
- [85] Jakubikova J, Sedlak J. Garlic-derived organosulfides induce cytotoxicity, apoptosis, cell cycle arrest and oxidative stress in human colon carcinoma cell lines. *Neoplasia* 2006; 53: 191-9.
- [86] Ramoutar RR, Brumaghim JL. Antioxidant and anticancer properties and mechanisms of inorganic selenium, oxo-sulfur, and oxo-selenium compounds. *Cell Biochem Biophys* 2010; 58: 1-23.
- [87] Hirsch K, Danilenko M, Giat J, *et al.* Effect of purified allicin, the major ingredient of freshly crushed garlic, on cancer cell proliferation. *Nutr Cancer* 2000; 38: 245-54.
- [88] Sahu RP, Zhang R, Batra S, Shi Y, Srivastava SK. Benzyl isothiocyanate-mediated generation of reactive oxygen species causes cell cycle arrest and induces apoptosis via activation of MAPK in human pancreatic cancer cells. *Carcinogenesis* 2009; 30: 1744-53.
- [89] Wu CL, Huang AC, Yang JS, *et al.* Benzyl isothiocyanate (BITC) and phenethyl isothiocyanate (PEITC)-mediated generation of reactive oxygen species causes cell cycle arrest and induces apoptosis via activation of caspase-3, mitochondria dysfunction and nitric oxide (NO) in human osteogenic sarcoma U-2 OS cells. *J Orthop Res* 2011; 29: 1199-209.
- [90] Lin YT, Yang JS, Lin SY, *et al.* Diallyl disulfide (DADS) induces apoptosis in human cervical cancer Ca Ski cells via reactive oxygen species and Ca<sup>2+</sup>-dependent mitochondria-dependent pathway. *Anticancer Res* 2008; 28: 2791-9.
- [91] Yang JS, Chen GW, Hsia TC, *et al.* Diallyl disulfide induces apoptosis in human colon cancer cell line (COLO 205) through the induction of reactive oxygen species, endoplasmic reticulum stress, caspases cascade and mitochondria-dependent pathways. *Food Chem Toxicol* 2009; 47: 171-9.
- [92] Zhang G, Wu H, Zhu B, Shimoiishi Y, Nakamura Y, Murata Y. Effect of dimethyl sulfides on the induction of apoptosis in human leukemia Jurkat cells and HL-60 cells. *Biosci Biotechnol Biochem* 2008; 72: 2966-72.

- [93] Davies NJ, Hayden RE, Simpson PJ, *et al.* AKR1C isoforms represent a novel cellular target for jasmonates alongside their mitochondrial-mediated effects. *Cancer Res* 2009; 69: 4769-75.
- [94] Lu X, Yu H, Ma Q, Shen S, Das UN. Linoleic acid suppresses colorectal cancer cell growth by inducing oxidant stress and mitochondrial dysfunction. *Lipids Health Dis* 2010; 9: 106.
- [95] Cury-Boaventura MF, Curi R. Regulation of reactive oxygen species (ROS) production by C18 fatty acids in Jurkat and Raji cells. *Clin Sci (Lond)* 2005; 108: 245-53.
- [96] Das UN. Tumoricidal action of cis-unsaturated fatty acids and their relationship to free radicals and lipid peroxidation. *Cancer Lett* 1991; 56: 235-43.
- [97] Vartak S, Robbins ME, Spector AA. The selective cytotoxicity of gamma-linolenic acid (GLA) is associated with increased oxidative stress. *Adv Exp Med Biol* 1999; 469: 493-8.
- [98] Panopoulos A, Harraz M, Engelhardt JF, Zandi E. Iron-mediated H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production as a mechanism for cell type-specific inhibition of tumor necrosis factor alpha-induced but not interleukin-1beta-induced IkappaB kinase complex/nuclear factor-kappaB activation. *J Biol Chem* 2005; 280: 2912-23.
- [99] Hallak M, Vazana L, Shpilberg O, Levy I, Mazar J, Nathan I. A molecular mechanism for mimosine-induced apoptosis involving oxidative stress and mitochondrial activation. *Apoptosis* 2008; 13: 147-55.
- [100] Osseni RA, Rat P, Bogdan A, Wamet JM, Touitou Y. Evidence of prooxidant and antioxidant action of melatonin on human liver cell line HepG2. *Life Sci* 2000; 68: 387-99.
- [101] Bejarano I, Espino J, Barriga C, Reiter RJ, Pariente JA, Rodriguez AB. Pro-oxidant effect of melatonin in tumour leucocytes: relation with its cytotoxic and pro-apoptotic effects. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2011; 108: 14-20.
- [102] Kim JH, Lee SY, Oh SY, *et al.* Methyl jasmonate induces apoptosis through induction of Bax/Bcl-XS and activation of caspase-3 via ROS production in A549 cells. *Oncol Rep* 2004; 12: 1233-8.
- [103] Rose P, Whiteman M, Huang SH, Halliwell B, Ong CN. beta-Phenylethyl isothiocyanate-mediated apoptosis in hepatoma HepG2 cells. *Cell Mol Life Sci* 2003; 60: 1489-503.
- [104] Trachootham D, Zhou Y, Zhang H, *et al.* Selective killing of oncogenically transformed cells through a ROS-mediated mechanism by beta-phenylethyl isothiocyanate. *Cancer Cell* 2006; 10: 241-52.
- [105] Aquilano K, Filomeni G, Di Renzo L, *et al.* Reactive oxygen and nitrogen species are involved in sorbitol-induced apoptosis of human erythroleukaemia cells K562. *Free Radic Res* 2007; 41: 452-60.
- [106] Singh SV, Srivastava SK, Choi S, *et al.* Sulforaphane-induced cell death in human prostate cancer cells is initiated by reactive oxygen species. *J Biol Chem* 2005; 280: 19911-24.
- [107] Choi WY, Choi BT, Lee WH, Choi YH. Sulforaphane generates reactive oxygen species leading to mitochondrial perturbation for apoptosis in human leukemia U937 cells. *Biomed Pharmacother* 2008; 62: 637-44.
- [108] Hong SH, Kim J, Kim JM, *et al.* Apoptosis induction of 2'-hydroxycinnamaldehyde as a proteasome inhibitor is associated with ER stress and mitochondrial perturbation in cancer cells. *Biochem Pharmacol* 2007; 74: 557-65.
- [109] Han DC, Lee MY, Shin KD, *et al.* 2'-benzoyloxy-cinnamaldehyde induces apoptosis in human carcinoma via reactive oxygen species. *J Biol Chem* 2004; 279(8): 6911-20.
- [110] Innok P, Rukachaisirikul T, Phongpaichit S, Suksamram A. Fuscarpans A-C, new pterocarpans from the stems of *Erythrina fusca*. *Fitoterapia* 2010; 81: 518-23.
- [111] Lin CN, Chen HL, Yen MH. Flavonoids with DNA strand-scission activity from *Rhus javanica* var. *roxburghiana*. *Fitoterapia* 2008; 79: 32-6.
- [112] Banjerdpongchai R, Punyati P, Nakrob A, Pompimon W, Kongtawelert P. 4'-Hydroxycinnamaldehyde from *Alpinia galanga* (Linn.) Induces Human Leukemic Cell Apoptosis via Mitochondrial and Endoplasmic Reticulum Stress Pathways. *Asian Pac J Cancer Prev* 2011; 12: 593-8.
- [113] Zheng LF, Dai F, Zhou B, Yang L, Liu ZL. Prooxidant activity of hydroxycinnamic acids on DNA damage in the presence of Cu(II) ions: mechanism and structure-activity relationship. *Food Chem Toxicol* 2008; 46: 149-56.
- [114] Fan GJ, Jin XL, Qian YP, *et al.* Hydroxycinnamic acids as DNA-cleaving agents in the presence of Cu(II) ions: mechanism, structure-activity relationship, and biological implications. *Chemistry* 2009; 15: 12889-99.
- [115] Hsu YL, Chen CY, Hou MF, *et al.* 6-Dehydrogingerdione, an active constituent of dietary ginger, induces cell cycle arrest and apoptosis through reactive oxygen species/c-Jun N-terminal kinase pathways in human breast cancer cells. *Mol Nutr Food Res* 2010; 54: 1307-17.
- [116] Chen CY, Tai CJ, Cheng JT, *et al.* 6-dehydrogingerdione sensitizes human hepatoblastoma Hep G2 cells to TRAIL-induced apoptosis via reactive oxygen species-mediated increase of DR5. *J Agric Food Chem* 2010; 58: 5604-11.
- [117] Wang CC, Chen LG, Lee LT, Yang LL. Effects of 6-gingerol, an antioxidant from ginger, on inducing apoptosis in human leukemic HL-60 cells. *In vivo* 2003; 17: 641-5.
- [118] Nigam N, Bhui K, Prasad S, George J, Shukla Y. [6]-Gingerol induces reactive oxygen species regulated mitochondrial cell death pathway in human epidermoid carcinoma A431 cells. *Chem Biol Interact* 2009; 181: 77-84.
- [119] Pan MH, Hsieh MC, Kuo JM, *et al.* 6-Shogaol induces apoptosis in human colorectal carcinoma cells via ROS production, caspase activation, and GADD 153 expression. *Mol Nutr Food Res* 2008; 52: 527-37.
- [120] Shieh PC, Chen YO, Kuo DH, *et al.* Induction of apoptosis by [8]-shogaol via reactive oxygen species generation, glutathione depletion, and caspase activation in human leukemia cells. *J Agric Food Chem* 2010; 58: 3847-54.
- [121] Pan MH, Lai CS, Hsu PC, Wang YJ. Acacetin induces apoptosis in human gastric carcinoma cells accompanied by activation of caspase cascades and production of reactive oxygen species. *J Agric Food Chem* 2005; 53: 620-30.
- [122] Shim HY, Park JH, Paik HD, Nah SY, Kim DS, Han YS. Acacetin-induced apoptosis of human breast cancer MCF-7 cells involves caspase cascade, mitochondria-mediated death signaling and SAPK/JNK1/2-c-Jun activation. *Mol Cells* 2007; 24: 95-104.
- [123] Yang J, Xiao YL, He XR, Qiu GF, Hu XM. Aesculetin-induced apoptosis through a ROS-mediated mitochondrial dysfunction pathway in human cervical cancer cells. *J Asian Nat Prod Res* 2010; 12: 185-93.
- [124] Lee HZ, Lin CJ, Yang WH, Leung WC, Chang SP. Aloe-emodin induced DNA damage through generation of reactive oxygen species in human lung carcinoma cells. *Cancer Lett* 2006; 239: 55-63.
- [125] Lin ML, Lu YC, Chung JG, *et al.* Aloe-emodin induces apoptosis of human nasopharyngeal carcinoma cells via caspase-8-mediated activation of the mitochondrial death pathway. *Cancer Lett* 2010; 291: 46-58.
- [126] Miyoshi N, Naniwa K, Yamada T, Osawa T, Nakamura Y. Dietary flavonoid apigenin is a potential inducer of intracellular oxidative stress: the role in the interruptive apoptotic signal. *Arch Biochem Biophys* 2007; 466: 274-82.
- [127] Shukla S, Gupta S. Apigenin-induced prostate cancer cell death is initiated by reactive oxygen species and p53 activation. *Free Radic Biol Med* 2008; 44: 1833-45.
- [128] Yoshino M, Haneda M, Naruse M, Murakami K. Prooxidant activity of flavonoids: copper-dependent strand breaks and the formation of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in DNA. *Mol Genet Metab* 1999; 68: 468-72.
- [129] Taniguchi H, Yoshida T, Horinaka M, *et al.* Baicalein overcomes tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand resistance via two different cell-specific pathways in cancer cells but not in normal cells. *Cancer Res* 2008; 68: 8918-27.
- [130] Ueda S, Nakamura H, Masutani H, *et al.* Baicalin induces apoptosis via mitochondrial pathway as prooxidant. *Mol Immunol* 2002; 38: 781-91.
- [131] Lu HF, Hsueh SC, Ho YT, *et al.* ROS mediates baicalin-induced apoptosis in human promyelocytic leukemia HL-60 cells through the expression of the Gadd153 and mitochondrial-dependent pathway. *Anticancer Res* 2007; 27: 117-25.
- [132] Mattia CJ, LeBel CP, Bondy SC. Effects of toluene and its metabolites on cerebral reactive oxygen species generation. *Biochem Pharmacol* 1991; 42: 879-82.

- [133] Bassi AM, Penco S, Canuto RA, Muzio G, Ferro M. Comparative evaluation of cytotoxicity and metabolism of four aldehydes in two hepatoma cell lines. *Drug Chem Toxicol* 1997; 20: 173-87.
- [134] Rubio S, Quintana J, Eiroa JL, Triana J, Estevez F. Betuletol 3-methyl ether induces G(2)-M phase arrest and activates the sphingomyelin and MAPK pathways in human leukemia cells. *Mol Carcinog* 2010; 49: 32-43.
- [135] Moon DO, Kim MO, Choi YH, Hyun JW, Chang WY, Kim GY. Butein induces G(2)/M phase arrest and apoptosis in human hepatoma cancer cells through ROS generation. *Cancer Lett* 2010; 288: 204-13.
- [136] Lee YS. Role of NADPH oxidase-mediated generation of reactive oxygen species in the mechanism of apoptosis induced by phenolic acids in HepG2 human hepatoma cells. *Arch Pharm Res* 2005; 28: 1183-9.
- [137] Hanham AF, Dunn BP, Stich HF. Clastogenic activity of caffeic acid and its relationship to hydrogen peroxide generated during autooxidation. *Mutat Res* 1983; 116: 333-9.
- [138] Luo M, Liu X, Zu Y, *et al.* Cajanol, a novel anticancer agent from Pigeonpea [*Cajanus cajan* (L.) Millsp.] roots, induces apoptosis in human breast cancer cells through a ROS-mediated mitochondrial pathway. *Chem Biol Interact* 2010; 188: 151-60.
- [139] Damianaki A, Bakogeorgou E, Kampa M, *et al.* Potent inhibitory action of red wine polyphenols on human breast cancer cells. *J Cell Biochem* 2000; 78: 429-41.
- [140] Lu N, Chen P, Yang Q, Peng YY. Anti- and pro-oxidant effects of (+)-catechin on hemoglobin-induced protein oxidative damage. *Toxicol In vitro* 2011; 25: 833-8.
- [141] Barreto GE, dos Santos GS, Egito ES, El Bacha RS. Catechol inhibits FADH<sub>2</sub>-linked respiration in rat liver mitochondrial fraction. *Acta Cir Bras* 2005; 20 (Suppl 1): 72-7.
- [142] Barreto G, Madureira D, Capani F, Aon-Bertolino L, Saraceno E, Alvarez-Giraldez LD. The role of catechols and free radicals in benzene toxicity: an oxidative DNA damage pathway. *Environ Mol Mutagen* 2009; 50: 771-80.
- [143] Moran JL, Siegel D, Sun XM, Ross D. Induction of apoptosis by benzene metabolites in HL60 and CD34+ human bone marrow progenitor cells. *Mol Pharmacol* 1996; 50: 610-5.
- [144] Yi ZC, Liu YZ, Li HX, Wang Z. Prooxidant action of chebulinic acid and tellimagrandin I: causing copper-dependent DNA strand breaks. *Toxicol In vitro* 2009; 23: 425-31.
- [145] Saleem A, Husheem M, Harkonen P, Pihlaja K. Inhibition of cancer cell growth by crude extract and the phenolics of *Terminalia chebula* retz. fruit. *J Ethnopharmacol* 2002; 81: 327-36.
- [146] Rakshit S, Mandal L, Pal BC, *et al.* Involvement of ROS in chlorogenic acid-induced apoptosis of Bcr-Abl+ CML cells. *Biochem Pharmacol* 2010; 80: 1662-75.
- [147] Yamanaka N, Oda O, Nagao S. Prooxidant activity of caffeic acid, dietary non-flavonoid phenolic acid, on Cu<sup>2+</sup>-induced low density lipoprotein oxidation. *FEBS Lett* 1997; 405: 186-90.
- [148] Jiang Y, Kusama K, Satoh K, Takayama E, Watanabe S, Sakagami H. Induction of cytotoxicity by chlorogenic acid in human oral tumor cell lines. *Phytomedicine* 2000; 7: 483-91.
- [149] Sugihara N, Arakawa T, Ohnishi M, Furuno K. Anti- and pro-oxidative effects of flavonoids on metal-induced lipid hydroperoxide-dependent lipid peroxidation in cultured hepatocytes loaded with alpha-linolenic acid. *Free Radic Biol Med* 1999; 27: 1313-23.
- [150] Zhang T, Chen X, Qu L, Wu J, Cui R, Zhao Y. Chrysin and its phosphate ester inhibit cell proliferation and induce apoptosis in Hela cells. *Bioorg Med Chem* 2004; 12: 6097-105.
- [151] Naso L, Ferrer EG, Lezama L, Rojo T, Etcheverry SB, Williams P. Role of oxidative stress in the antitumoral action of a new vanadyl(IV) complex with the flavonoid chrysin in two osteoblast cell lines: relationship with the radical scavenger activity. *J Biol Inorg Chem* 2010; 15: 889-902.
- [152] Kim JA, Lau EK, Pan L, De Blanco EJ. NF-kappaB inhibitors from *Brucea javanica* exhibiting intracellular effects on reactive oxygen species. *Anticancer Res* 2010; 30: 3295-300.
- [153] Lu CC, Yang JS, Huang AC, *et al.* Chrysophanol induces necrosis through the production of ROS and alteration of ATP levels in J5 human liver cancer cells. *Mol Nutr Food Res* 2010; 54: 967-76.
- [154] Kuo ML, Huang TS, Lin JK. Curcumin, an antioxidant and anti-tumor promoter, induces apoptosis in human leukemia cells. *Biochim Biophys Acta* 1996; 1317: 95-100.
- [155] Woo JH, Kim YH, Choi YJ, *et al.* Molecular mechanisms of curcumin-induced cytotoxicity: induction of apoptosis through generation of reactive oxygen species, down-regulation of Bcl-XL and IAP, the release of cytochrome c and inhibition of Akt. *Carcinogenesis* 2003; 24: 1199-208.
- [156] Cvorovic J, Tramer F, Granzotto M, Candussio L, Decorti G, Passamonti S. Oxidative stress-based cytotoxicity of delphinidin and cyanidin in colon cancer cells. *Arch Biochem Biophys* 2010; 501: 151-7.
- [157] Fukumoto LR, Mazza G. Assessing antioxidant and prooxidant activities of phenolic compounds. *J Agric Food Chem* 2000; 48: 3597-604.
- [158] Katsuzaki H, Hibasami H, Ohwaki S, *et al.* Cyanidin 3-O-beta-D-glucoside isolated from skin of black Glycine max and other anthocyanins isolated from skin of red grape induce apoptosis in human lymphoid leukemia Molt 4B cells. *Oncol Rep* 2003; 10: 297-300.
- [159] Feng R, Ni HM, Wang SY, *et al.* Cyanidin-3-rutinoside, a natural polyphenol antioxidant, selectively kills leukemic cells by induction of oxidative stress. *J Biol Chem* 2007; 282: 13468-76.
- [160] Jin S, Zhang QY, Kang XM, Wang JX, Zhao WH. Daidzein induces MCF-7 breast cancer cell apoptosis via the mitochondrial pathway. *Ann Oncol* 2010; 21: 263-8.
- [161] Lu HF, Wang HL, Chuang YY, *et al.* Danthron induced apoptosis through mitochondria- and caspase-3-dependent pathways in human brain glioblastoma multiforms GBM 8401 cells. *Neurochem Res* 2010; 35: 390-8.
- [162] Chiang JH, Yang JS, Ma CY, *et al.* Danthron, an anthraquinone derivative, induces DNA damage and caspase cascades-mediated apoptosis in SNU-1 human gastric cancer cells through mitochondrial permeability transition pores and Bax-triggered pathways. *Chem Res Toxicol* 2011; 24: 20-9.
- [163] Riveiro ME, Moglioni A, Vazquez R, *et al.* Structural insights into hydroxycoumarin-induced apoptosis in U-937 cells. *Bioorg Med Chem* 2008; 16: 2665-75.
- [164] Hou DX, Ose T, Lin S, *et al.* Anthocyanidins induce apoptosis in human promyelocytic leukemia cells: structure-activity relationship and mechanisms involved. *Int J Oncol* 2003; 23: 705-12.
- [165] Hou DX, Tong X, Terahara N, Luo D, Fujii M. Delphinidin 3-sambubioside, a Hibiscus anthocyanin, induces apoptosis in human leukemia cells through reactive oxygen species-mediated mitochondrial pathway. *Arch Biochem Biophys* 2005; 440: 101-9.
- [166] Hazra B, Das SM, Kumar B, *et al.* Cytotoxicity of diospyrin and its derivatives in relation to the generation of reactive oxygen species in tumour cells *in vitro* and *in vivo*. *Chemotherapy* 2007; 53: 173-6.
- [167] Bhosle SM, Huilgol NG, Mishra KP. Enhancement of radiation-induced oxidative stress and cytotoxicity in tumor cells by ellagic acid. *Clin Chim Acta* 2005; 359: 89-100.
- [168] Lin SY, Lai WW, Ho CC, *et al.* Emodin induces apoptosis of human tongue squamous cancer SCC-4 cells through reactive oxygen species and mitochondria-dependent pathways. *Anticancer Res* 2009; 29: 327-35.
- [169] Azam S, Hadi N, Khan NU, Hadi SM. Prooxidant property of green tea polyphenols epicatechin and epigallocatechin-3-gallate: implications for anticancer properties. *Toxicol In vitro* 2004; 18: 555-61.
- [170] Chung LY, Cheung TC, Kong SK, *et al.* Induction of apoptosis by green tea catechins in human prostate cancer DU145 cells. *Life Sci* 2001; 68: 1207-14.
- [171] Yang GY, Liao J, Kim K, Yurkow EJ, Yang CS. Inhibition of growth and induction of apoptosis in human cancer cell lines by tea polyphenols. *Carcinogenesis* 1998; 19: 611-6.
- [172] Habtemariam S, Dagne E. Comparative antioxidant, prooxidant and cytotoxic activity of sigmoidin A and eriodictyol. *Planta Med* 2010; 76: 589-94.
- [173] Paya M, Halliwell B, Houlst JR. Interactions of a series of coumarins with reactive oxygen species. Scavenging of superoxide, hypochlorous acid and hydroxyl radicals. *Biochem Pharmacol* 1992; 44: 205-14.
- [174] Yoo CB, Han KT, Cho KS, *et al.* Eugenol isolated from the essential oil of *Eugenia caryophyllata* induces a reactive oxygen species-mediated apoptosis in HL-60 human promyelocytic leukemia cells. *Cancer Lett* 2005; 225: 41-52.



- [175] Herrerias T, de Oliveira BH, Gomes MA, *et al.* Eupafolin: Effect on mitochondrial energetic metabolism. *Bioorg Med Chem* 2008; 16: 854-61.
- [176] Chung KS, Choi JH, Back NI, *et al.* Eupafolin, a flavonoid isolated from *Artemisia princeps*, induced apoptosis in human cervical adenocarcinoma HeLa cells. *Mol Nutr Food Res* 2010; 54: 1318-28.
- [177] Dabaghi-Barbosa P, Mariante RA, Franco da Cruz LA, *et al.* Hispidulin: antioxidant properties and effect on mitochondrial energy metabolism. *Free Radic Res* 2005; 39: 1305-15.
- [178] Galati G, Sabzevari O, Wilson JX, O'Brien PJ. Prooxidant activity and cellular effects of the phenoxyl radicals of dietary flavonoids and other polyphenolics. *Toxicology* 2002; 177: 91-104.
- [179] Kim JY, Jeon YK, Jeon W, Nam MJ. Fisetin induces apoptosis in Huh-7 cells via downregulation of BIRC8 and Bcl2L2. *Food Chem Toxicol* 2010; 48: 2259-64.
- [180] Kuo YF, Su YZ, Tseng YH, Wang SY, Wang HM, Chueh PJ. Flavokawain B, a novel chalcone from *Alpinia pricei* Hayata with potent apoptotic activity: Involvement of ROS and GADD153 upstream of mitochondria-dependent apoptosis in HCT116 cells. *Free Radic Biol Med* 2010; 49: 214-26.
- [181] Paya M, Goodwin PA, De Las HB, Hoult JR. Superoxide scavenging activity in leukocytes and absence of cellular toxicity of a series of coumarins. *Biochem Pharmacol* 1994; 48: 445-51.
- [182] Inoue M, Suzuki R, Koide T, Sakaguchi N, Ogiwara Y, Yabu Y. Antioxidant, gallic acid, induces apoptosis in HL-60RG cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1994; 204: 898-904.
- [183] Chen HM, Wu YC, Chia YC, *et al.* Gallic acid, a major component of *Toona sinensis* leaf extracts, contains a ROS-mediated anticancer activity in human prostate cancer cells. *Cancer Lett* 2009; 286: 161-71.
- [184] Ortiz-Sanchez E, Daniels TR, Helguera G, Martinez-Maza O, Bonavida B, Penichet ML. Enhanced cytotoxicity of an anti-transferrin receptor IgG3-avidin fusion protein in combination with gambogic acid against human malignant hematopoietic cells: functional relevance of iron, the receptor, and reactive oxygen species. *Leukemia* 2009; 23: 59-70.
- [185] Nie F, Zhang X, Qi Q, *et al.* Reactive oxygen species accumulation contributes to gambogic acid-induced apoptosis in human hepatoma SMMC-7721 cells. *Toxicology* 2009; 260: 60-7.
- [186] Ullah MF, Ahmad A, Zubair H, *et al.* Soy isoflavone genistein induces cell death in breast cancer cells through mobilization of endogenous copper ions and generation of reactive oxygen species. *Mol Nutr Food Res* 2011; 55: 553-9.
- [187] Isakovic A, Jankovic T, Harhaji L, *et al.* Antiglioma action of xanthones from *Gentiana kochiana*: Mechanistic and structure-activity requirements. *Bioorg Med Chem* 2008; 16: 5683-94.
- [188] Pardo-Andreu GL, Nunez-Figueroa Y, Tudella VG, *et al.* The anti-cancer agent guthiferone-A permeabilizes mitochondrial membrane: Ensuing energetic and oxidative stress implications. *Toxicol Appl Pharmacol* 2011; 253: 282-9.
- [189] So FV, Guthrie N, Chambers AF, Moussa M, Carroll KK. Inhibition of human breast cancer cell proliferation and delay of mammary tumorigenesis by flavonoids and citrus juices. *Nutr Cancer* 1996; 26: 167-81.
- [190] Choi EJ, Kim GD, Chee KM, Kim GH. Effects of hesperetin on vessel structure formation in mouse embryonic stem (mES) cells. *Nutrition* 2006; 22: 947-51.
- [191] Fabiani R, Fuccelli R, Pieravanti F, De Bartolomeo A, Morozzi G. Production of hydrogen peroxide is responsible for the induction of apoptosis by hydroxytyrosol on HL60 cells. *Mol Nutr Food Res* 2009; 53: 887-96.
- [192] Li S, Dong P, Wang J, *et al.* Icarin, a natural flavonol glycoside, induces apoptosis in human hepatoma SMMC-7721 cells via a ROS/JNK-dependent mitochondrial pathway. *Cancer Lett* 2010; 298: 222-30.
- [193] Atsumi T, Fujisawa S, Tonosaki K. A comparative study of the antioxidant/prooxidant activities of eugenol and isoeugenol with various concentrations and oxidation conditions. *Toxicol In vitro* 2005; 19: 1025-33.
- [194] Fujisawa S, Atsumi T, Ishihara M, Kadoma Y. Cytotoxicity, ROS-generation activity and radical-scavenging activity of curcumin and related compounds. *Anticancer Res* 2004; 24: 563-9.
- [195] Iwashita K, Kobori M, Yamaki K, Tsushida T. Flavonoids inhibit cell growth and induce apoptosis in B16 melanoma 4A5 cells. *Bio-sci Biotechnol Biochem* 2000; 64: 1813-20.
- [196] Aithal BK, Kumar MR, Rao BN, Udupa N, Rao BS. Juglone, a naphthoquinone from walnut, exerts cytotoxic and genotoxic effects against cultured melanoma tumor cells. *Cell Biol Int* 2009; 33: 1039-49.
- [197] Ji YB, Qu ZY, Zou X. Juglone-induced apoptosis in human gastric cancer SGC-7901 cells via the mitochondrial pathway. *Exp Toxicol Pathol* 2011; 63: 69-78.
- [198] Sharma V, Joseph C, Ghosh S, Agarwal A, Mishra MK, Sen E. Kaempferol induces apoptosis in glioblastoma cells through oxidative stress. *Mol Cancer Ther* 2007; 6: 2544-53.
- [199] Calderon-Montano JM, Burgos-Moron E, Perez-Guerrero C, Lopez-Lazaro M. A review on the dietary flavonoid kaempferol. *Mini Rev Med Chem* 2011; 11: 298-344.
- [200] Zhang SP, Zhou YJ, Liu Y, Cai YQ. Effect of liquiritigenin, a flavanone existed from *Radix glycyrrhizae* on pro-apoptotic in SMMC-7721 cells. *Food Chem Toxicol* 2009; 47: 693-701.
- [201] Ju W, Wang X, Shi H, Chen W, Belinsky SA, Lin Y. A critical role of luteolin-induced reactive oxygen species in blockage of tumor necrosis factor-activated nuclear factor-kappaB pathway and sensitization of apoptosis in lung cancer cells. *Mol Pharmacol* 2007; 71: 1381-8.
- [202] Lopez-Lazaro M. Distribution and biological activities of the flavonoid luteolin. *Mini Rev Med Chem* 2009; 9: 31-59.
- [203] Katsube N, Iwashita K, Tsushida T, Yamaki K, Kobori M. Induction of apoptosis in cancer cells by Bilberry (*Vaccinium myrtillus*) and the anthocyanins. *J Agric Food Chem* 2003; 51: 68-75.
- [204] Shih PH, Yeh CT, Yen GC. Effects of anthocyanidin on the inhibition of proliferation and induction of apoptosis in human gastric adenocarcinoma cells. *Food Chem Toxicol* 2005; 43: 1557-66.
- [205] Passi S, Picardo M, Nazzaro-Porro M. Comparative cytotoxicity of phenols *in vitro*. *Biochem J* 1987; 245: 537-42.
- [206] Kuo HM, Chang LS, Lin YL, *et al.* Morin inhibits the growth of human leukemia HL-60 cells via cell cycle arrest and induction of apoptosis through mitochondria dependent pathway. *Anticancer Res* 2007; 27: 395-405.
- [207] Wang IK, Lin-Shiau SY, Lin JK. Induction of apoptosis by apigenin and related flavonoids through cytochrome c release and activation of caspase-9 and caspase-3 in leukaemia HL-60 cells. *Eur J Cancer* 1999; 35: 1517-25.
- [208] Sahu SC, Gray GC. Lipid peroxidation and DNA damage induced by morin and naringenin in isolated rat liver nuclei. *Food Chem Toxicol* 1997; 35: 443-7.
- [209] Kanno S, Tomizawa A, Hiura T, *et al.* Inhibitory effects of naringenin on tumor growth in human cancer cell lines and sarcoma S-180-implanted mice. *Biol Pharm Bull* 2005; 28: 527-30.
- [210] Biswal SS, Datta K, Shaw SD, Feng X, Robertson JD, Kehrer JP. Glutathione oxidation and mitochondrial depolarization as mechanisms of nordihydroguaiaretic acid-induced apoptosis in lipoxigenase-deficient FL5.12 cells. *Toxicol Sci* 2000; 53: 77-83.
- [211] Sahu SC, Ruggles DI, O'Donnell MW. Prooxidant activity and toxicity of nordihydroguaiaretic acid in clone-9 rat hepatocyte cultures. *Food Chem Toxicol* 2006; 44: 1751-7.
- [212] Rowe DL, Ozbay T, Bender LM, Nahta R. Nordihydroguaiaretic acid, a cytotoxic insulin-like growth factor-I receptor/HER2 inhibitor in trastuzumab-resistant breast cancer. *Mol Cancer Ther* 2008; 7: 1900-8.
- [213] Chow JM, Huang GC, Shen SC, Wu CY, Lin CW, Chen YC. Differential apoptotic effect of wogonin and nor-wogonin via stimulation of ROS production in human leukemia cells. *J Cell Biochem* 2008; 103: 1394-404.
- [214] Zhang Y, Seeram NP, Lee R, Feng L, Heber D. Isolation and identification of strawberry phenolics with antioxidant and human cancer cell antiproliferative properties. *J Agric Food Chem* 2008; 56: 670-5.
- [215] Hu H, Lee HJ, Jiang C, *et al.* Penta-1,2,3,4,6-O-galloyl-beta-D-glucose induces p53 and inhibits STAT3 in prostate cancer cells *in vitro* and suppresses prostate xenograft tumor growth *in vivo*. *Mol Cancer Ther* 2008; 7: 2681-91.
- [216] Yin S, Dong Y, Li J, Lu J, Hu H. Penta-1,2,3,4,6-O-galloyl-beta-D-glucose induces senescence-like terminal S-phase arrest in human hepatoma and breast cancer cells. *Mol Carcinom* 2011; 50: 592-600.

- [217] Chen PN, Chu SC, Chiou HL, Chiang CL, Yang SF, Hsieh YS. Cyanidin 3-glucoside and peonidin 3-glucoside inhibit tumor cell growth and induce apoptosis *in vitro* and suppress tumor growth *in vivo*. *Nutr Cancer* 2005; 53: 232-43.
- [218] Kobori M, Shimoto H, Tsushida T, Shinohara K. Phloretin-induced apoptosis in B16 melanoma 4A5 cells by inhibition of glucose transmembrane transport. *Cancer Lett* 1997; 119: 207-12.
- [219] Srinivas P, Gopinath G, Banerji A, Dinakar A, Srinivas G. Plumbagin induces reactive oxygen species, which mediate apoptosis in human cervical cancer cells. *Mol Carcinog* 2004; 40: 201-11.
- [220] Wang CC, Chiang YM, Sung SC, Hsu YL, Chang JK, Kuo PL. Plumbagin induces cell cycle arrest and apoptosis through reactive oxygen species/c-Jun N-terminal kinase pathways in human melanoma A375.S2 cells. *Cancer Lett* 2008; 259: 82-98.
- [221] Sakano K, Mizutani M, Murata M, Oikawa S, Hiraku Y, Kawanishi S. Procyanidin B2 has anti- and pro-oxidant effects on metal-mediated DNA damage. *Free Radic Biol Med* 2005; 39: 1041-9.
- [222] Miura T, Chiba M, Kasai K, *et al.* Apple procyanidins induce tumor cell apoptosis through mitochondrial pathway activation of caspase-3. *Carcinogenesis* 2008; 29: 585-93.
- [223] Chen WY, Hsieh YA, Tsai CI, *et al.* Protoapigenone, a natural derivative of apigenin, induces mitogen-activated protein kinase-dependent apoptosis in human breast cancer cells associated with induction of oxidative stress and inhibition of glutathione S-transferase pi. *Invest New Drugs* 2011; 29: 1347-59.
- [224] Aboul-Enein HY, Kladna A, Kruk I, Lichszeld K, Michalska T. Effect of psoralens on Fenton-like reaction generating reactive oxygen species. *Biopolymers* 2003; 72: 59-68.
- [225] Wu JZ, Situ ZQ, Wang W, Chen JY, Liu B. Antitumor activity of psoralen on mucocypidermoid carcinoma cell line MEC-1. *Chin Med J (Engl)* 1992; 105: 913-7.
- [226] Chakraborty A, Gupta N, Ghosh K, Roy P. *In vitro* evaluation of the cytotoxic, anti-proliferative and anti-oxidant properties of pterostilbene isolated from *Pterocarpus marsupium*. *Toxicol In vitro* 2010; 24: 1215-28.
- [227] Juan ME, Wenzel U, Daniel H, Planas JM. Resveratrol induces apoptosis through ROS-dependent mitochondria pathway in HT-29 human colorectal carcinoma cells. *J Agric Food Chem* 2008; 56: 4813-8.
- [228] Low IC, Chen ZX, Pervaiz S. Bcl-2 modulates resveratrol-induced ROS production by regulating mitochondrial respiration in tumor cells. *Antioxid Redox Signal* 2010; 13: 807-19.
- [229] Lin S, Fujii M, Hou DX. Rhein induces apoptosis in HL-60 cells via reactive oxygen species-independent mitochondrial death pathway. *Arch Biochem Biophys* 2003; 418: 99-107.
- [230] Lin ML, Chen SS, Lu YC, *et al.* Rhein induces apoptosis through induction of endoplasmic reticulum stress and Ca<sup>2+</sup>-dependent mitochondrial death pathway in human nasopharyngeal carcinoma cells. *Anticancer Res* 2007; 27: 3313-22.
- [231] Murakami K, Haneda M, Qiao S, Naruse M, Yoshino M. Prooxidant action of rosmarinic acid: transition metal-dependent generation of reactive oxygen species. *Toxicol In vitro* 2007; 21: 613-7.
- [232] Xavier CP, Lima CF, Fernandes-Ferreira M, Pereira-Wilson C. *Salvia fruticosa*, *Salvia officinalis*, and rosmarinic acid induce apoptosis and inhibit proliferation of human colorectal cell lines: the role in MAPK/ERK pathway. *Nutr Cancer* 2009; 61: 564-71.
- [233] Park EJ, Lim JH, Nam SI, Park JW, Kwon TK. Rottlerin induces heme oxygenase-1 (HO-1) up-regulation through reactive oxygen species (ROS) dependent and PKC delta-independent pathway in human colon cancer HT29 cells. *Biochimie* 2010; 92: 110-5.
- [234] Ohno I, Eibl G, Odinkova I, *et al.* Rottlerin stimulates apoptosis in pancreatic cancer cells through interactions with proteins of the Bcl-2 family. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2010; 298: G63-G73.
- [235] Elema ET, Schripsema J, Malingré TM. Flavones and flavonol glycosides from *Eupatorium cannabinum* L. *Pharm Weekbl Sci* 1989; 11(5): 161-4.
- [236] Bourougaa E, Bertrand J, Despeaux M, *et al.* Hammada scoparia flavonoids and rutin kill adherent and chemoresistant leukemic cells. *Leuk Res* 2011; 35: 1093-101.
- [237] Estevez M, Kylli P, Puolanne E, Kivikari R, Heinonen M. Oxidation of skeletal muscle myofibrillar proteins in oil-in-water emulsions: interaction with lipids and effect of selected phenolic compounds. *J Agric Food Chem* 2008; 56: 10933-40.
- [238] Labuda J, Buckova M, Heilerova L, Silhar S, Stepanek I. Evaluation of the redox properties and anti/pro-oxidant effects of selected flavonoids by means of a DNA-based electrochemical biosensor. *Anal Bioanal Chem* 2003; 376: 168-73.
- [239] Chen Z, Silva H, Klessig DF. Active oxygen species in the induction of plant systemic acquired resistance by salicylic acid. *Science* 1993; 262: 1883-6.
- [240] Spitz GA, Furtado CM, Sola-Penna M, Zancan P. Acetylsalicylic acid and salicylic acid decrease tumor cell viability and glucose metabolism modulating 6-phosphofructo-1-kinase structure and activity. *Biochem Pharmacol* 2009; 77: 46-53.
- [241] Simic A, Manojlovic D, Segan D, Todorovic M. Electrochemical behavior and antioxidant and prooxidant activity of natural phenolics. *Molecules* 2007; 12: 2327-40.
- [242] Chen CH, Chern CL, Lin CC, *et al.* Involvement of reactive oxygen species, but not mitochondrial permeability transition in the apoptotic induction of human SK-Hep-1 hepatoma cells by shikonin. *Planta Med* 2003; 69: 1119-24.
- [243] Hsu PC, Huang YT, Tsai ML, Wang YJ, Lin JK, Pan MH. Induction of apoptosis by shikonin through coordinative modulation of the Bcl-2 family, p27, and p53, release of cytochrome c, and sequential activation of caspases in human colorectal carcinoma cells. *J Agric Food Chem* 2004; 52: 6330-7.
- [244] Kajimoto S, Takanashi N, Kajimoto T, *et al.* Sophoranolone, extracted from a traditional Chinese medicine Shan Dou Gen, induces apoptosis in human leukemia U937 cells via formation of reactive oxygen species and opening of mitochondrial permeability transition pores. *Int J Cancer* 2002; 99(6): 879-90.
- [245] Ramanathan R, Tan CH, Das NP. Cytotoxic effect of plant polyphenols and fat-soluble vitamins on malignant human cultured cells. *Cancer Lett* 1992; 62: 217-24.
- [246] Khan NS, Ahmad A, Hadi SM. Anti-oxidant, pro-oxidant properties of tannic acid and its binding to DNA. *Chem Biol Interact* 2000; 125: 177-89.
- [247] Brusselmans K, Vrolix R, Verhoeven G, Swinnen JV. Induction of cancer cell apoptosis by flavonoids is associated with their ability to inhibit fatty acid synthase activity. *J Biol Chem* 2005; 280: 5636-45.
- [248] Hsu YL, Hou MF, Tsai EM, Kuo PL. Tricetin, a Dietary Flavonoid, Induces Apoptosis through the Reactive Oxygen Species/c-Jun NH(2)-Terminal Kinase Pathway in Human Liver Cancer Cells. *J Agric Food Chem* 2010; 58: 12547-12556.
- [249] Han D, Matsumaru K, Rettori D, Kaplowitz N. Usnic acid-induced necrosis of cultured mouse hepatocytes: inhibition of mitochondrial function and oxidative stress. *Biochem Pharmacol* 2004; 67: 439-51.
- [250] Bezivin C, Tomasi S, Rouaud I, Delcros JG, Boustie J. Cytotoxic activity of compounds from the lichen: *Cladonia convoluta*. *Planta Med* 2004; 70: 874-7.
- [251] Ho K, Yazan LS, Ismail N, Ismail M. Apoptosis and cell cycle arrest of human colorectal cancer cell line HT-29 induced by vanillin. *Cancer Epidemiol* 2009; 33: 155-60.
- [252] Lirdprapamongkol K, Sakurai H, Kawasaki N, *et al.* Vanillin suppresses *in vitro* invasion and *in vivo* metastasis of mouse breast cancer cells. *Eur J Pharm Sci* 2005; 25: 57-65.
- [253] Castor LR, Locatelli KA, Ximenes VF. Pro-oxidant activity of apocynin radical. *Free Radic Biol Med* 2010; 48: 1636-43.
- [254] Wei L, Lu N, Dai Q, *et al.* Different apoptotic effects of wogonin via induction of H(2)O(2) generation and Ca(2+) overload in malignant hepatoma and normal hepatic cells. *J Cell Biochem* 2010; 111: 1629-41.
- [255] Yu JQ, Liu HB, Tian DZ, Liu YW, Lei JC, Zou GL. Changes in mitochondrial membrane potential and reactive oxygen species during wogonin-induced cell death in human hepatoma cells. *Hepatol Res* 2007; 37: 68-76.
- [256] Monteghirlo S, Tosetti F, Ambrosini C, *et al.* Antileukemia effects of xanthohumol in Bcr/Abl-transformed cells involve nuclear factor-kappaB and p53 modulation. *Mol Cancer Ther* 2008; 7: 2692-702.
- [257] Strathmann J, Klimo K, Sauer SW, Okun JG, Prehn JH, Gerhauser C. Xanthohumol-induced transient superoxide anion radical formation triggers cancer cells into apoptosis via a mitochondria-mediated mechanism. *FASEB J* 2010; 24: 2938-50.

- [258] Viola G, Fortunato E, Cecconet L, Disaro S, Basso G. Induction of apoptosis in Jurkat cells by photoexcited psoralen derivatives: Implication of mitochondrial dysfunctions and caspases activation. *Toxicol In vitro* 2007; 21: 211-6.
- [259] Joshi PC, Pathak MA. Production of singlet oxygen and superoxide radicals by psoralens and their biological significance. *Biochem Biophys Res Commun* 1983; 112: 638-46.
- [260] Makino T, Tsubouchi R, Murakami K, Haneda M, Yoshino M. Generation of reactive oxygen species and induction of apoptosis of HL60 cells by ingredients of traditional herbal medicine, Shosaiko-to. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2006; 98: 401-5.
- [261] Lee CS, Kim YJ, Lee MS, Han ES, Lee SJ. 18beta-Glycyrrhetic acid induces apoptotic cell death in SiHa cells and exhibits a synergistic effect against antibiotic anti-cancer drug toxicity. *Life Sci* 2008; 83: 481-9.
- [262] Yang S, Evens AM, Prachand S, *et al.* Mitochondrial-mediated apoptosis in lymphoma cells by the diterpenoid lactone andrographolide, the active component of *Andrographis paniculata*. *Clin Cancer Res* 2010; 16: 4755-68.
- [263] Efferth T, Oesch F. Oxidative stress response of tumor cells: microarray-based comparison between artemisinins and anthracyclines. *Biochem Pharmacol* 2004; 68: 3-10.
- [264] Mercer AE, Copple IM, Maggs JL, O'Neill PM, Park BK. The role of heme and the mitochondrion in the chemical and molecular mechanisms of mammalian cell death induced by the artemisinin antimalarials. *J Biol Chem* 2011; 286: 987-96.
- [265] Singh NP, Lai HC. Artemisinin induces apoptosis in human cancer cells. *Anticancer Res* 2004; 24: 2277-80.
- [266] Park BC, Bosire KO, Lee ES, Lee YS, Kim JA. Asiatic acid induces apoptosis in SK-MEL-2 human melanoma cells. *Cancer Lett* 2005; 218: 81-90.
- [267] Zhang YB, Ye YP, Wu XD, Sun HX. Astilbotriterpenic acid induces growth arrest and apoptosis in HeLa cells through mitochondria-related pathways and reactive oxygen species (ROS) production. *Chem Biodivers* 2009; 6: 218-30.
- [268] Liu WK, Ho JC, Cheung FW, Liu BP, Ye WC, Che CT. Apoptotic activity of betulinic acid derivatives on murine melanoma B16 cell line. *Eur J Pharmacol* 2004; 498: 71-8.
- [269] Tibodeau JD, Isham CR, Bible KC. Annatto constituent cis-bixin has selective antimyeloma effects mediated by oxidative stress and associated with inhibition of thioredoxin and thioredoxin reductase. *Antioxid Redox Signal* 2010; 13: 987-97.
- [270] Sun L, Chen T, Wang X, Chen Y, Wei X. Bufalin Induces Reactive Oxygen Species Dependent Bax Translocation and Apoptosis in ASTC-a-1 Cells. *Evid Based Complement Alternat Med* 2009 [Epub ahead of print].
- [271] Ligresti A, Moriello AS, Starowicz K, *et al.* Antitumor activity of plant cannabinoids with emphasis on the effect of cannabidiol on human breast carcinoma. *J Pharmacol Exp Ther* 2006; 318: 1375-87.
- [272] McAllister SD, Murase R, Christian RT, *et al.* Pathways mediating the effects of cannabidiol on the reduction of breast cancer cell proliferation, invasion, and metastasis. *Breast Cancer Res Treat* 2011; 129: 37-47.
- [273] Shrivastava A, Kuzontkoski PM, Groopman JE, Prasad A. Cannabidiol Induces Programmed Cell Death in Breast Cancer Cells by Coordinating the Cross-talk between Apoptosis and Autophagy. *Mol Cancer Ther* 2011; 10: 1161-72.
- [274] Lee MG, Lee KT, Chi SG, Park JH. Costunolide induces apoptosis by ROS-mediated mitochondrial permeability transition and cytochrome C release. *Biol Pharm Bull* 2001; 24: 303-6.
- [275] Park HJ, Kwon SH, Han YN, *et al.* Apoptosis-Inducing costunolide and a novel acyclic monoterpene from the stem bark of *Magnolia sieboldii*. *Arch Pharm Res* 2001; 24: 342-8.
- [276] Yasuda S, Yogosawa S, Izutani Y, Nakamura Y, Watanabe H, Sakai T. Cucurbitacin B induces G2 arrest and apoptosis via a reactive oxygen species-dependent mechanism in human colon adenocarcinoma SW480 cells. *Mol Nutr Food Res* 2010; 54: 559-65.
- [277] Wang Y, Che CM, Chiu JF, He QY. Dioscin (saponin)-induced generation of reactive oxygen species through mitochondria dysfunction: a proteomic-based study. *J Proteome Res* 2007; 6: 4703-10.
- [278] Liu MJ, Wang Z, Ju Y, Wong RN, Wu QY. Diosgenin induces cell cycle arrest and apoptosis in human leukemia K562 cells with the disruption of Ca<sup>2+</sup> homeostasis. *Cancer Chemother Pharmacol* 2005; 55: 79-90.
- [279] Allouche Y, Warleta F, Campos M, *et al.* Antioxidant, antiproliferative, and pro-apoptotic capacities of pentacyclic triterpenes found in the skin of olives on MCF-7 human breast cancer cells and their effects on DNA damage. *J Agric Food Chem* 2011; 59: 121-30.
- [280] Martin R, Ibeas E, Carvalho-Tavares J, Hernandez M, Ruiz-Gutierrez V, Nieto ML. Natural triterpenic diols promote apoptosis in astrocytoma cells through ROS-mediated mitochondrial depolarization and JNK activation. *PLoS One* 2009; 4: e5975.
- [281] Yazlovitskaya EM, Melnykovych G. Selective farnesol toxicity and translocation of protein kinase C in neoplastic HeLa-S3K and non-neoplastic CF-3 cells. *Cancer Lett* 1995; 88: 179-83.
- [282] Machida K, Tanaka T, Fujita K, Taniguchi M. Farnesol-induced generation of reactive oxygen species via indirect inhibition of the mitochondrial electron transport chain in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* 1998; 180: 4460-5.
- [283] Joo JH, Jetten AM. Molecular mechanisms involved in farnesol-induced apoptosis. *Cancer Lett* 2010; 287: 123-35.
- [284] Chan WH. Ginkgolide B induces apoptosis and developmental injury in mouse embryonic stem cells and blastocysts. *Hum Reprod* 2006; 21: 2985-95.
- [285] DeFeudis FV, Papadopoulos V, Drieu K. Ginkgo biloba extracts and cancer: a research area in its infancy. *Fundam Clin Pharmacol* 2003; 17: 405-17.
- [286] Kim HE, Oh JH, Lee SK, Oh YJ. Ginsenoside RH-2 induces apoptotic cell death in rat C6 glioma via a reactive oxygen- and caspase-dependent but Bcl-X(L)-independent pathway. *Life Sci* 1999; 65: L33-L40.
- [287] Ham YM, Lim JH, Na HK, *et al.* Ginsenoside-Rh2-induced mitochondrial depolarization and apoptosis are associated with reactive oxygen species- and Ca<sup>2+</sup>-mediated c-Jun NH2-terminal kinase 1 activation in HeLa cells. *J Pharmacol Exp Ther* 2006; 319: 1276-85.
- [288] Gao LW, Zhang J, Yang WH, Wang B, Wang JW. Glaucocalyxin A induces apoptosis in human leukemia HL-60 cells through mitochondria-mediated death pathway. *Toxicol In vitro* 2011; 25: 51-63.
- [289] Singh SV, Choi S, Zeng Y, Hahm ER, Xiao D. Guggulsterone-induced apoptosis in human prostate cancer cells is caused by reactive oxygen intermediate dependent activation of c-Jun NH2-terminal kinase. *Cancer Res* 2007; 67: 7439-49.
- [290] Samudio I, Konopleva M, Safe S, McQueen T, Andreeff M. Guggulsterones induce apoptosis and differentiation in acute myeloid leukemia: identification of isomer-specific antileukemic activities of the pregnadienedione structure. *Mol Cancer Ther* 2005; 4: 1982-92.
- [291] Chen JC, Lu KW, Lee JH, Yeh CC, Chung JG. Gypenosides induced apoptosis in human colon cancer cells through the mitochondria-dependent pathways and activation of caspase-3. *Anticancer Res* 2006; 26: 4313-26.
- [292] Chen JC, Lu KW, Tsai ML, *et al.* Gypenosides induced G0/G1 arrest via CHK2 and apoptosis through endoplasmic reticulum stress and mitochondria-dependent pathways in human tongue cancer SCC-4 cells. *Oral Oncol* 2009; 45: 273-83.
- [293] Hoffmann R, von Schwarzenberg K, Lopez-Anton N, *et al.* Helenalin bypasses Bcl-2-mediated cell death resistance by inhibiting NF-kappaB and promoting reactive oxygen species generation. *Biochem Pharmacol* 2011; 82: 453-63.
- [294] Usta J, Kreydiyyeh S, Knio K, Barnabe P, Bou-Moughlabay Y, Dagher S. Linalool decreases HepG2 viability by inhibiting mitochondrial complexes I and II, increasing reactive oxygen species and decreasing ATP and GSH levels. *Chem Biol Interact* 2009; 180: 39-46.
- [295] Prasad S, Nigam N, Kalra N, Shukla Y. Regulation of signaling pathways involved in lupeol induced inhibition of proliferation and induction of apoptosis in human prostate cancer cells. *Mol Carcinog* 2008; 47: 916-24.
- [296] Yeh S, Hu M. Antioxidant and pro-oxidant effects of lycopene in comparison with beta-carotene on oxidant-induced damage in Hs68 cells. *J Nutr Biochem* 2000; 11: 548-54.



- [297] Yeh SL, Huang CS, Hu ML. Lycopene enhances UVA-induced DNA damage and expression of heme oxygenase-1 in cultured mouse embryo fibroblasts. *Eur J Nutr* 2005; 44: 365-70.
- [298] Muller K, Carpenter KL, Challis IR, Skepper JN, Arends MJ. Carotenoids induce apoptosis in the T-lymphoblast cell line Jurkat E6.1. *Free Radic Res* 2002; 36: 791-802.
- [299] Newman RA, Yang P, Hittelman WN, et al. Oleandrin-mediated oxidative stress in human melanoma cells. *J Exp Ther Oncol* 2006; 5: 167-81.
- [300] Martin R, Carvalho-Tavares J, Ibeas E, Hernandez M, Ruiz-Gutierrez V, Nieto ML. Acidic triterpenes compromise growth and survival of astrocytoma cell lines by regulating reactive oxygen species accumulation. *Cancer Res* 2007; 67: 3741-51.
- [301] Fernandes J, Castilho RO, da Costa MR, Wagner-Souza K, Coelho Kaplan MA, Gattass CR. Pentacyclic triterpenes from Chrysobalanaceae species: cytotoxicity on multidrug resistant and sensitive leukemia cell lines. *Cancer Lett* 2003; 190(2): 165-9.
- [302] Babich H, Visioli F. *In vitro* cytotoxicity to human cells in culture of some phenolics from olive oil. *Farmacol* 2003; 58: 403-7.
- [303] Mazziotti A, Mazziotti F, Pantusa M, Sportelli L, Sindona G. Pro-oxidant activity of oleuropein determined *in vitro* by electron spin resonance spin-trapping methodology. *J Agric Food Chem* 2006; 54: 7444-9.
- [304] Han J, Talorete TP, Yamada P, Isoda H. Anti-proliferative and apoptotic effects of oleuropein and hydroxytyrosol on human breast cancer MCF-7 cells. *Cytotechnology* 2009; 59: 45-53.
- [305] Huang J, Wu L, Tashiro S, Onodera S, Ikejima T. Reactive oxygen species mediate oridonin-induced HepG2 apoptosis through p53, MAPK, and mitochondrial signaling pathways. *J Pharmacol Sci* 2008; 107: 370-9.
- [306] Huang YT, Chueh SC, Teng CM, Guh JH. Investigation of ouabain-induced anticancer effect in human androgen-independent prostate cancer PC-3 cells. *Biochem Pharmacol* 2004; 67: 727-33.
- [307] Hou YY, Wu ML, Hwang YC, Chang FR, Wu YC, Wu CC. The natural diterpenoid ovatodiolide induces cell cycle arrest and apoptosis in human oral squamous cell carcinoma Ca9-22 cells. *Life Sci* 2009; 85: 26-32.
- [308] Lin HL, Liu TY, Chau GY, Lui WY, Chi CW. Comparison of 2-methoxyestradiol-induced, docetaxel-induced, and paclitaxel-induced apoptosis in hepatoma cells and its correlation with reactive oxygen species. *Cancer* 2000; 89: 983-94.
- [309] Wang YF, Chen CY, Chung SF, Chiou YH, Lo HR. Involvement of oxidative stress and caspase activation in paclitaxel-induced apoptosis of primary effusion lymphoma cells. *Cancer Chemother Pharmacol* 2004; 54: 322-30.
- [310] Wen J, You KR, Lee SY, Song CH, Kim DG. Oxidative stress-mediated apoptosis. The anticancer effect of the sesquiterpene lactone parthenolide. *J Biol Chem* 2002; 277: 38954-64.
- [311] Zhang S, Ong CN, Shen HM. Critical roles of intracellular thiols and calcium in parthenolide-induced apoptosis in human colorectal cancer cells. *Cancer Lett* 2004; 208: 143-53.
- [312] Mills JJ, Chari RS, Boyer IJ, Gould MN, Jirtle RL. Induction of apoptosis in liver tumors by the monoterpene perillyl alcohol. *Cancer Res* 1995; 55: 979-83.
- [313] Lebedeva IV, Su ZZ, Vozhilla N, et al. Mechanism of *in vitro* pancreatic cancer cell growth inhibition by melanoma differentiation-associated gene-7/interleukin-24 and perillyl alcohol. *Cancer Res* 2008; 68: 7439-47.
- [314] Allouche N, Apel C, Martin MT, Dumontet V, Gueritte F, Litaudon M. Cytotoxic sesquiterpenoids from Winteraceae of Caledonian rainforest. *Phytochemistry* 2009; 70: 546-53.
- [315] Machida K, Tanaka T, Taniguchi M. Depletion of glutathione as a cause of the promotive effects of polygodial, a sesquiterpene on the production of reactive oxygen species in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biosci Bioeng* 1999; 88: 526-30.
- [316] Byun JY, Kim MJ, Eum DY, et al. Reactive oxygen species-dependent activation of Bax and poly(ADP-ribose) polymerase-1 is required for mitochondrial cell death induced by triterpenoid pristimerin in human cervical cancer cells. *Mol Pharmacol* 2009; 76: 734-44.
- [317] Eum DY, Byun JY, Yoon CH, et al. Triterpenoid pristimerin synergizes with taxol to induce cervical cancer cell death through reactive oxygen species-mediated mitochondrial dysfunction. *Anticancer Drugs* 2011; 22: 763-73.
- [318] Wang W, Zhao Y, Rayburn ER, Hill DL, Wang H, Zhang R. *In vitro* anti-cancer activity and structure-activity relationships of natural products isolated from fruits of *Panax ginseng*. *Cancer Chemother Pharmacol* 2007; 59: 589-601.
- [319] Liu ZQ, Luo XY, Liu GZ, Chen YP, Wang ZC, Sun YX. *In vitro* study of the relationship between the structure of ginsenoside and its antioxidative or prooxidative activity in free radical induced hemolysis of human erythrocytes. *J Agric Food Chem* 2003; 51: 2555-8.
- [320] Ni Y, Gong XG, Lu M, Chen HM, Wang Y. Mitochondrial ROS burst as an early sign in sarsapogenin-induced apoptosis in HepG2 cells. *Cell Biol Int* 2008; 32: 337-43.
- [321] Goncharov I, Weiner L, Vogel Z. Delta9-tetrahydrocannabinol increases C6 glioma cell death produced by oxidative stress. *Neuroscience* 2005; 134: 567-74.
- [322] Deb DD, Parimala G, Saravana DS, Chakraborty T. Effect of thymol on peripheral blood mononuclear cell PBMC and acute promyelotic cancer cell line HL-60. *Chem Biol Interact* 2011; 193: 97-106.
- [323] Xu B, Guo X, Mathew S, et al. Triptolide simultaneously induces reactive oxygen species, inhibits NF-kappaB activity and sensitizes 5-fluorouracil in colorectal cancer cell lines. *Cancer Lett* 2010; 291: 200-8.
- [324] Wu PP, Liu KC, Huang WW, et al. Triptolide induces apoptosis in human adrenal cancer NCI-H295 cells through a mitochondrial-dependent pathway. *Oncol Rep* 2011; 25: 551-7.
- [325] Prasad S, Yadav VR, Kannappan R, Aggarwal BB. Ursolic acid, a pentacyclic triterpene, potentiates TRAIL-induced apoptosis through p53-independent up-regulation of death receptors: evidence for the role of reactive oxygen species and JNK. *J Biol Chem* 2011; 286: 5546-57.
- [326] Malik F, Kumar A, Bhushan S, et al. Reactive oxygen species generation and mitochondrial dysfunction in the apoptotic cell death of human myeloid leukemia HL-60 cells by a dietary compound withaferin A with concomitant protection by N-acetyl cysteine. *Apoptosis* 2007; 12: 2115-33.
- [327] Mayola E, Galleme C, Esposti DD, et al. Withaferin A induces apoptosis in human melanoma cells through generation of reactive oxygen species and down-regulation of Bcl-2. *Apoptosis* 2011; 16: 1014-27.
- [328] Swamy SM, Huat BT. Intracellular glutathione depletion and reactive oxygen species generation are important in alpha-hederin-induced apoptosis of P388 cells. *Mol Cell Biochem* 2003; 245: 127-39.
- [329] Legault J, Dahl W, Debiton E, Pichette A, Madelmont JC. Antitumor activity of balsam fir oil: production of reactive oxygen species induced by alpha-humulene as possible mechanism of action. *Planta Med* 2003; 69: 402-7.
- [330] Lin KW, Huang AM, Tu HY, et al. Xanthine oxidase inhibitory triterpenoid and phloroglucinol from guttiferaceous plants inhibit growth and induced apoptosis in human NTUB1 cells through a ROS-dependent mechanism. *J Agric Food Chem* 2011; 59: 407-14.
- [331] Kalariya NM, Ramana KV, Srivastava SK, van Kuijk FJ. Carotenoid derived aldehydes-induced oxidative stress causes apoptotic cell death in human retinal pigment epithelial cells. *Exp Eye Res* 2008; 86: 70-80.
- [332] Palozza P, Luberto C, Calviello G, Ricci P, Bartoli GM. Antioxidant and prooxidant role of beta-carotene in murine normal and tumor thymocytes: effects of oxygen partial pressure. *Free Radic Biol Med* 1997; 22: 1065-73.
- [333] Schwartz J, Shklar G. The selective cytotoxic effect of carotenoids and alpha-tocopherol on human cancer cell lines *in vitro*. *J Oral Maxillofac Surg* 1992; 50: 367-73.
- [334] Shen DY, Kang JH, Song W, et al. Apoptosis of Human Cholangiocarcinoma Cell Lines induced by beta-Escin through Mitochondrial Caspase-dependent Pathway. *Phytother Res* 2011; 25: 1519-26.
- [335] Zhang Y, Soboloff J, Zhu Z, Berger SA. Inhibition of Ca<sup>2+</sup> influx is required for mitochondrial reactive oxygen species-induced endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> depletion and cell death in leukemia cells. *Mol Pharmacol* 2006; 70: 1424-34.
- [336] Brown J, Higo H, McKalip A, Herman B. Human papillomavirus (HPV) 16 E6 sensitizes cells to atraction-induced apoptosis:



- role of p53, ICE-like proteases and the mitochondrial permeability transition. *J Cell Biochem* 1997; 66: 245-55.
- [337] Awad AB, Burr AT, Fink CS. Effect of resveratrol and beta-sitosterol in combination on reactive oxygen species and prostaglandin release by PC-3 cells. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2005; 72: 219-26.
- [338] Arrick BA, Griffio W, Cohn Z, Nathan C. Hydrogen peroxide from cellular metabolism of cystine. A requirement for lysis of murine tumor cells by vernolepin, a glutathione-depleting antineoplastic. *J Clin Invest* 1985; 76: 567-74.
- [339] Lee YJ, Yin HQ, Kim YH, Li GY, Lee BH. Apoptosis inducing effects of 6-methoxydihydrosanguinarine in HT29 colon carcinoma cells. *Arch Pharm Res* 2004; 27: 1253-7.
- [340] Yin HQ, Kim YH, Moon CK, Lee BH. Reactive oxygen species-mediated induction of apoptosis by a plant alkaloid 6-methoxydihydrosanguinarine in HepG2 cells. *Biochem Pharmacol* 2005; 70: 242-8.
- [341] Chen TC, Lai KC, Yang JS, *et al.* Involvement of reactive oxygen species and caspase-dependent pathway in berberine-induced cell cycle arrest and apoptosis in C6 rat glioma cells. *Int J Oncol* 2009; 34: 1681-90.
- [342] Burgeiro A, Gajate C, Dakir eH, Villa-Pulgarin JA, Oliveira PJ, Mollinedo F. Involvement of mitochondrial and B-Raf/ERK signaling pathways in berberine-induced apoptosis in human melanoma cells. *Anticancer Drugs* 2011; 22(6): 507-18.
- [343] Konrath EL, Santin K, Nassif M, Latini A, Henriques A, Salbego C. Antioxidant and pro-oxidant properties of boldine on hippocampal slices exposed to oxygen-glucose deprivation *in vitro*. *Neurotoxicology* 2008; 29: 1136-40.
- [344] Gerhardt D, Horn AP, Gaelzer MM, *et al.* Boldine: a potential new antiproliferative drug against glioma cell lines. *Invest New Drugs* 2009; 27: 517-52.
- [345] Azam S, Hadi N, Khan NU, Hadi SM. Antioxidant and prooxidant properties of caffeine, theobromine and xanthine. *Med Sci Monit* 2003; 9: BR325-BR330.
- [346] Lu PZ, Lai CY, Chan WH. Caffeine induces cell death via activation of apoptotic signal and inactivation of survival signal in human osteoblasts. *Int J Mol Sci* 2008; 9: 698-718.
- [347] Liu WH, Chang LS. Caffeine induces matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) and MMP-9 down-regulation in human leukemia U937 cells via Ca<sup>2+</sup>/ROS-mediated suppression of ERK/c-fos pathway and activation of p38 MAPK/c-jun pathway. *J Cell Physiol* 2010; 224: 775-85.
- [348] Li Y, Rory GC, Sang Y, Rosen EM, Latorra J, Xia S. Camptothecin and Fas receptor agonists synergistically induce medulloblastoma cell death: ROS-dependent mechanisms. *Anticancer Drugs* 2009; 20: 770-8.
- [349] Furusawa S, Wu J, Fujimura T, *et al.* Cepharanthine inhibits proliferation of cancer cells by inducing apoptosis. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 1998; 20: 87-97.
- [350] Biswas KK, Tanchaoen S, Sarker KP, Kawahara K, Hashiguchi T, Maruyama I. Cepharanthine triggers apoptosis in a human hepatocellular carcinoma cell line (HuH-7) through the activation of JNK1/2 and the downregulation of Akt. *FEBS Lett* 2006; 580: 703-10.
- [351] Yamamoto S, Seta K, Morisco C, Vatner SF, Sadoshima J. Chelerythrine rapidly induces apoptosis through generation of reactive oxygen species in cardiac myocytes. *J Mol Cell Cardiol* 2001; 33: 1829-48.
- [352] Matkar SS, Wrischnik LA, Hellmann-Blumberg U. Production of hydrogen peroxide and redox cycling can explain how sanguinarine and chelerythrine induce rapid apoptosis. *Arch Biochem Biophys* 2008; 477: 43-52.
- [353] Kaminsky V, Kulachkovskyy O, Stoika R. A decisive role of mitochondria in defining rate and intensity of apoptosis induction by different alkaloids. *Toxicol Lett* 2008; 177: 168-81.
- [354] DeMarini DM, Lawrence BK. Prophage induction by DNA topoisomerase II poisons and reactive-oxygen species: role of DNA breaks. *Mutat Res* 1992; 267: 1-17.
- [355] Poljakova J, Eckschlager T, Hrabeta J, *et al.* The mechanism of cytotoxicity and DNA adduct formation by the anticancer drug ellipticine in human neuroblastoma cells. *Biochem Pharmacol* 2009; 77: 1466-79.
- [356] Stiborova M, Rupertova M, Frei E. Cytochrome P450- and peroxidase-mediated oxidation of anticancer alkaloid ellipticine dictates its anti-tumor efficiency. *Biochim Biophys Acta* 2011; 1814: 175-85.
- [357] Cai Z, Lin M, Wuchter C, *et al.* Apoptotic response to homoharringtonine in human wt p53 leukemic cells is independent of reactive oxygen species generation and implicates Bax translocation, mitochondrial cytochrome c release and caspase activation. *Leukemia* 2001; 15: 567-74.
- [358] Pires dM, Curi TC, Miyasaka CK, Palanch AC, Curi R. Effect of indole acetic acid on oxygen metabolism in cultured rat neutrophil. *Gen Pharmacol* 1998; 31: 573-8.
- [359] Kim DS, Kim SY, Jeong YM, *et al.* Light-activated indole-3-acetic acid induces apoptosis in g361 human melanoma cells. *Biol Pharm Bull* 2006; 29: 2404-9.
- [360] Shimamoto K, Dewa Y, Ishii Y, *et al.* Indole-3-carbinol enhances oxidative stress responses resulting in the induction of preneoplastic liver cell lesions in partially hepatectomized rats initiated with diethylnitrosamine. *Toxicology* 2011; 283: 109-17.
- [361] Mandal SK, Biswas R, Bhattacharyya SS, *et al.* Lycopodium clavatum extract inhibits proliferation of HeLa cells through induction of apoptosis via caspase-3 activation. *Eur J Pharmacol* 2010; 626: 115-22.
- [362] Singhal PC, Kapasi AA, Reddy K, Franki N, Gibbons N, Ding G. Morphine promotes apoptosis in Jurkat cells. *J Leukoc Biol* 1999; 66: 650-8.
- [363] Lin X, Wang YJ, Li Q, *et al.* Chronic high-dose morphine treatment promotes SH-SY5Y cell apoptosis via c-Jun N-terminal kinase-mediated activation of mitochondria-dependent pathway. *FEBS J* 2009; 276: 2022-36.
- [364] Zhang Y, Liu H, Jin J, Zhu X, Lu L, Jiang H. The role of endogenous reactive oxygen species in oxymatrine-induced caspase-3-dependent apoptosis in human melanoma A375 cells. *Anticancer Drugs* 2010; 21: 494-501.
- [365] Kekre N, Griffin C, McNulty J, Pandey S. Pancratistatin causes early activation of caspase-3 and the flipping of phosphatidyl serine followed by rapid apoptosis specifically in human lymphoma cells. *Cancer Chemother Pharmacol* 2005; 56: 29-38.
- [366] Siedlakowski P, McLachlan-Burgess A, Griffin C, Tirumalai SS, McNulty J, Pandey S. Synergy of Pancratistatin and Tamoxifen on breast cancer cells in inducing apoptosis by targeting mitochondria. *Cancer Biol Ther* 2008; 7: 376-84.
- [367] Duessel S, Heuertz RM, Ezekiel UR. Growth inhibition of human colon cancer cells by plant compounds. *Clin Lab Sci* 2008; 21: 151-7.
- [368] D'Cruz SC, Vaithinathan S, Saradha B, Mathur PP. Piperine activates testicular apoptosis in adult rats. *J Biochem Mol Toxicol* 2008; 22: 382-8.
- [369] Kluza J, Mazinghien R, Degardin K, Lansiaux A, Bailly C. Induction of apoptosis by the plant alkaloid sampangine in human HL-60 leukemia cells is mediated by reactive oxygen species. *Eur J Pharmacol* 2005; 525: 32-40.
- [370] Choi WY, Kim GY, Lee WH, Choi YH. Sanguinarine, a benzophenanthridine alkaloid, induces apoptosis in MDA-MB-231 human breast carcinoma cells through a reactive oxygen species-mediated mitochondrial pathway. *Chemotherapy* 2008; 54: 279-87.
- [371] Jin Q, Kang C, Soh Y, *et al.* Tetrandrine cytotoxicity and its dual effect on oxidative stress-induced apoptosis through modulating cellular redox states in Neuro 2a mouse neuroblastoma cells. *Life Sci* 2002; 71: 2053-66.
- [372] Liu C, Gong K, Mao X, Li W. Tetrandrine induces apoptosis by activating reactive oxygen species and repressing Akt activity in human hepatocellular carcinoma. *Int J Cancer* 2011; 129: 1519-31.
- [373] Ito S, Ihara T, Tamura H, *et al.* alpha-Tomatine, the major saponin in tomato, induces programmed cell death mediated by reactive oxygen species in the fungal pathogen *Fusarium oxysporum*. *FEBS Lett* 2007; 581: 3217-22.
- [374] Lee ST, Wong PF, Cheah SC, Mustafa MR. Alpha-tomatine induces apoptosis and inhibits nuclear factor-kappa B activation on human prostatic adenocarcinoma PC-3 cells. *PLoS One* 2011; 6(4): e18915.
- [375] Sordet O, Goldman A, Pommier Y. Topoisomerase II and tubulin inhibitors both induce the formation of apoptotic topoisomerase I cleavage complexes. *Mol Cancer Ther* 2006; 5: 3139-44.

- [376] Benguedouar L, Boussenane HN, Wided K, Alyane M, Rouibah H, Lahouel M. Efficiency of propolis extract against mitochondrial stress induced by antineoplastic agents (doxorubicin and vinblastin) in rats. *Indian J Exp Biol* 2008; 46: 112-9.
- [377] Woiniak A, Drewa G, Wozniak B, *et al.* The effect of antitumor drugs on oxidative stress in B16 and S91 melanoma cells *in vitro*. *Med Sci Monit* 2005; 11: BR22-BR29.
- [378] Groninger E, Meeuwse-De Boer GJ, De Graaf SS, Kamps WA, De Bont ES. Vincristine induced apoptosis in acute lymphoblastic leukaemia cells: a mitochondrial controlled pathway regulated by reactive oxygen species? *Int J Oncol* 2002; 21: 1339-45.
- [379] Pae HO, Oh GS, Choi BM, *et al.* Induction of apoptosis by 4-acetyl-12,13-epoxy-9-trichothecene-3,15-diol from *Isaria japonica* Yasuda through intracellular reactive oxygen species formation and caspase-3 activation in human leukemia HL-60 cells. *Toxicol In vitro* 2003; 17: 49-57.
- [380] Rogalska A, Koceva-Chyla A, Jozwiak Z. Aclarubicin-induced ROS generation and collapse of mitochondrial membrane potential in human cancer cell lines. *Chem Biol Interact* 2008; 176: 58-70.
- [381] Tsuruga M, Dang Y, Shiono Y, Oka S, Yamazaki Y. Differential effects of vitamin E and three hydrophilic antioxidants on the actinomycin D-induced and colcemid-accelerated apoptosis in human leukemia CMK-7 cell line. *Mol Cell Biochem* 2003; 250: 131-7.
- [382] Wang MJ, Liu S, Liu Y, Zheng D. Actinomycin D enhances TRAIL-induced caspase-dependent and -independent apoptosis in SH-SY5Y neuroblastoma cells. *Neurosci Res* 2007; 59: 40-6.
- [383] Garcia-Fernandez LF, Losada A, Alcaide V, *et al.* Aplidin induces the mitochondrial apoptotic pathway via oxidative stress-mediated JNK and p38 activation and protein kinase C delta. *Oncogene* 2002; 21: 7533-44.
- [384] Cuadrado A, Garcia-Fernandez LF, Gonzalez L, *et al.* Aplidin induces apoptosis in human cancer cells via glutathione depletion and sustained activation of the epidermal growth factor receptor, Src, JNK, and p38 MAPK. *J Biol Chem* 2003; 278: 241-50.
- [385] Taddei ML, Chiarugi P, Cuevas C, Ramponi G, Raugi G. Oxidation and inactivation of low molecular weight protein tyrosine phosphatase by the anticancer drug Aplidin. *Int J Cancer* 2006; 118: 2082-8.
- [386] Leaver HA, Williams JR, Smith C, Whittle IR. Intracellular oxidation by human glioma cell populations: effect of arachidonic acid. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2004; 70: 449-53.
- [387] Dymkowska D, Wojtczak L. Arachidonic acid-induced apoptosis in rat hepatoma AS-30D cells is mediated by reactive oxygen species. *Acta Biochim Pol* 2009; 56: 711-5.
- [388] Dassonneville L, Watez N, Baldeyrou B, *et al.* Inhibition of topoisomerase II by the marine alkaloid ascididemin and induction of apoptosis in leukemia cells. *Biochem Pharmacol* 2000; 60: 527-37.
- [389] Matsumoto SS, Biggs J, Copp BR, Holden JA, Barrows LR. Mechanism of ascididemin-induced cytotoxicity. *Chem Res Toxicol* 2003; 16: 113-22.
- [390] Cunningham ML, Ringrose PS, Lokesh BR. Bleomycin cytotoxicity is prevented by superoxide dismutase *in vitro*. *Cancer Lett* 1983; 21: 149-53.
- [391] Muller M, Strand S, Hug H, *et al.* Drug-induced apoptosis in hepatoma cells is mediated by the CD95 (APO-1/Fas) receptor/ligand system and involves activation of wild-type p53. *J Clin Invest* 1997; 99: 403-13.
- [392] Gao N, Shang B, Zhang X, *et al.* Potent antitumor actions of the new antibiotic boningmycin through induction of apoptosis and cellular senescence. *Anticancer Drugs* 2011; 22: 166-75.
- [393] Wang YM, Peng SQ, Zhou Q, *et al.* Depletion of intracellular glutathione mediates butenolide-induced cytotoxicity in HepG2 cells. *Toxicol Lett* 2006; 164: 231-8.
- [394] Lu HF, Chen YL, Yang JS, *et al.* Antitumor activity of capsaicin on human colon cancer cells *in vitro* and colo 205 tumor xenografts *in vivo*. *J Agric Food Chem* 2010; 58: 12999-3005.
- [395] Yang ZH, Wang XH, Wang HP, Hu LQ, Zheng XM, Li SW. Capsaicin mediates cell death in bladder cancer T24 cells through reactive oxygen species production and mitochondrial depolarization. *Urology* 2010; 75: 735-41.
- [396] Powell AA, LaRue JM, Batta AK, Martinez JD. Bile acid hydrophobicity is correlated with induction of apoptosis and/or growth arrest in HCT116 cells. *Biochem J* 2001; 356: 481-6.
- [397] Qin P, Tang X, Elloso MM, Harnish DC. Bile acids induce adhesion molecule expression in endothelial cells through activation of reactive oxygen species, NF-kappaB, and p38. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2006; 291: H741-H747.
- [398] Rosignoli P, Fabiani R, De Bartolomeo A, Fuccelli R, Pelli MA, Morozzi G. Genotoxic effect of bile acids on human normal and tumour colon cells and protection by dietary antioxidants and butyrate. *Eur J Nutr* 2008; 47: 301-9.
- [399] Araki Y, Katoh T, Ogawa A, *et al.* Bile acid modulates transepithelial permeability via the generation of reactive oxygen species in the Caco-2 cell line. *Free Radic Biol Med* 2005; 39: 769-80.
- [400] Zhang R, Gong J, Wang H, Wang L. Bile salts inhibit growth and induce apoptosis of human esophageal cancer cell line. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 5109-16.
- [401] Pardhasaradhi BV, Ali AM, Kumari AL, Reddanna P, Khar A. Phycocyanin-mediated apoptosis in AK-5 tumor cells involves down-regulation of Bcl-2 and generation of ROS. *Mol Cancer Ther* 2003; 2: 1165-70.
- [402] Hoyt MT, Palchadhuri R, Hergenrother PJ. Cribrostatin 6 induces death in cancer cells through a reactive oxygen species (ROS)-mediated mechanism. *Invest New Drugs* 2011; 29: 562-73.
- [403] Ravi D, Muniyappa H, Das KC. Endogenous thioredoxin is required for redox cycling of anthracyclines and p53-dependent apoptosis in cancer cells. *J Biol Chem* 2005; 280: 40084-96.
- [404] Martinez JD, Stratagoules ED, LaRue JM, *et al.* Different bile acids exhibit distinct biological effects: the tumor promoter deoxycholic acid induces apoptosis and the chemopreventive agent ursodeoxycholic acid inhibits cell proliferation. *Nutr Cancer* 1998; 31: 111-8.
- [405] Zhang X, Jiang L, Geng C, Cao J, Zhong L. The role of oxidative stress in deoxynivalenol-induced DNA damage in HepG2 cells. *Toxicol* 2009; 54: 513-8.
- [406] Krishnaswamy R, Devaraj SN, Padma VV. Lutein protects HT-29 cells against Deoxynivalenol-induced oxidative stress and apoptosis: prevention of NF-kappaB nuclear localization and down regulation of NF-kappaB and Cyclo-Oxygenase-2 expression. *Free Radic Biol Med* 2010; 49: 50-60.
- [407] Kang KS, Wang P, Yamabe N, Fukui M, Jay T, Zhu BT. Docosahexaenoic acid induces apoptosis in MCF-7 cells *in vitro* and *in vivo* via reactive oxygen species formation and caspase 8 activation. *PLoS One* 2010; 5: e10296.
- [408] Thayer WS. Adriamycin stimulated superoxide formation in sub-mitochondrial particles. *Chem Biol Interact* 1977; 19: 265-78.
- [409] Kuznetsov AV, Margreiter R, Amberger A, Saks V, Grimm M. Changes in mitochondrial redox state, membrane potential and calcium precede mitochondrial dysfunction in doxorubicin-induced cell death. *Biochim Biophys Acta* 2011; 1813: 1144-52.
- [410] Colquhoun A, Schumacher RI. gamma-Linolenic acid and eicosapentaenoic acid induce modifications in mitochondrial metabolism, reactive oxygen species generation, lipid peroxidation and apoptosis in Walker 256 rat carcinosarcoma cells. *Biochim Biophys Acta* 2001; 1533: 207-19.
- [411] Colquhoun A. Mechanisms of action of eicosapentaenoic acid in bladder cancer cells *in vitro*: alterations in mitochondrial metabolism, reactive oxygen species generation and apoptosis induction. *J Urol* 2009; 181: 1885-93.
- [412] Zourgui L, Golli EE, Bouaziz C, Bacha H, Hassen W. Cactus (*Opuntia ficus-indica*) cladodes prevent oxidative damage induced by the mycotoxin zearalenone in Balb/C mice. *Food Chem Toxicol* 2008; 46: 1817-24.
- [413] Banjerdpongchai R, Kongtawelert P, Khantamat O, *et al.* Mitochondrial and endoplasmic reticulum stress pathways cooperate in zearalenone-induced apoptosis of human leukemic cells. *J Hematol Oncol* 2010; 3: 50.
- [414] Kim KN, Heo SJ, Kang SM, Ahn G, Jeon YJ. Fucoxanthin induces apoptosis in human leukemia HL-60 cells through a ROS-mediated Bcl-xL pathway. *Toxicol In vitro* 2010; 24: 1648-54.
- [415] Kuo PL, Chen CY, Hsu YL. Isoobtusilactone A induces cell cycle arrest and apoptosis through reactive oxygen species/apoptosis signal-regulating kinase 1 signaling pathway in human breast cancer cells. *Cancer Res* 2007; 67: 7406-20.
- [416] Chen CY, Liu TZ, Chen CH, *et al.* Isoobtusilactone A-induced apoptosis in human hepatoma Hep G2 cells is mediated via increased NADPH oxidase-derived reactive oxygen species (ROS)

- production and the mitochondria-associated apoptotic mechanisms. *Food Chem Toxicol* 2007; 45: 1268-76.
- [417] Kuo PL, Chen CY, Tzeng TF, Lin CC, Hsu YL. Involvement of reactive oxygen species/c-Jun NH(2)-terminal kinase pathway in kotomolide A induces apoptosis in human breast cancer cells. *Toxicol Appl Pharmacol* 2008; 229: 215-26.
- [418] Lown JW, Begleiter A, Johnson D, Morgan AR. Studies related to antitumor antibiotics. Part V. Reactions of mitomycin C with DNA examined by ethidium fluorescence assay. *Can J Biochem* 1976; 54: 110-9.
- [419] Wang Y, Gray JP, Mishin V, Heck DE, Laskin DL, Laskin JD. Distinct roles of cytochrome P450 reductase in mitomycin C redox cycling and cytotoxicity. *Mol Cancer Ther* 2010; 9: 1852-63.
- [420] Matsunaga T, Tsuji Y, Kaai K, *et al.* Toxicity against gastric cancer cells by combined treatment with 5-fluorouracil and mitomycin c: implication in oxidative stress. *Cancer Chemother Pharmacol* 2010; 66: 517-26.
- [421] Sato K, Akaike T, Suga M, Ando M, Maeda H. Generation of free radicals from neocarzinostatin mediated by NADPH/cytochrome P-450 reductase via activation of enediyne chromophore. *Biochem Biophys Res Commun* 1994; 205: 1716-23.
- [422] Ohnishi S, Murata M, Oikawa S, *et al.* Oxidative DNA damage by an N-hydroxy metabolite of the mutagenic compound formed from norharman and aniline. *Mutat Res* 2001; 494: 63-72.
- [423] Zheng L, Yan X, Han X, *et al.* Identification of norharman as the cytotoxic compound produced by the sponge (*Hymeniacidon perleve*)-associated marine bacterium *Pseudoalteromonas piscicida* and its apoptotic effect on cancer cells. *Biotechnol Appl Biochem* 2006; 44: 135-42.
- [424] Baudrimont I, Betbeder AM, Gharbi A, Pfohl-Leszkowicz A, Dirheimer G, Creppy EE. Effect of superoxide dismutase and catalase on the nephrotoxicity induced by subchronical administration of ochratoxin A in rats. *Toxicology* 1994; 89: 101-11.
- [425] Arbillaga L, Azqueta A, Ezpeleta O, Lopez dC. Oxidative DNA damage induced by Ochratoxin A in the HK-2 human kidney cell line: evidence of the relationship with cytotoxicity. *Mutagenesis* 2007; 22: 35-42.
- [426] El Golli BE, Rodriguez-Enfedaque A, Bouaziz C, Ladjimi M, Renaud F, Bacha H. Toxicities induced in cultured human hepatocarcinoma cells exposed to ochratoxin A: oxidative stress and apoptosis status. *J Biochem Mol Toxicol* 2009; 23: 87-96.
- [427] Wu TS, Liao YC, Yu FY, Chang CH, Liu BH. Mechanism of patulin-induced apoptosis in human leukemia cells (HL-60). *Toxicol Lett* 2008; 183: 105-11.
- [428] Ferrer E, Juan-Garcia A, Font G, Ruiz MJ. Reactive oxygen species induced by beauvericin, patulin and zearalenone in CHO-K1 cells. *Toxicol In vitro* 2009; 23: 1504-9.
- [429] Zhou SM, Jiang LP, Geng CY, Cao J, Zhong LF. Patulin-induced oxidative DNA damage and p53 modulation in HepG2 cells. *Toxicol* 2010; 55: 390-5.
- [430] Russo A, Piovano M, Clericuzio M, *et al.* Putrescine-1,4-dicinnamide from *Pholiota spumosa* (Basidiomycetes) inhibits cell growth of human prostate cancer cells. *Phytomedicine* 2007; 14: 185-91.
- [431] Lin RJ, Cheng MJ, Huang JC, *et al.* Cytotoxic compounds from the stems of *Cinnamomum tenuifolium*. *J Nat Prod* 2009; 72: 1816-24.
- [432] Chaudhari M, Jayaraj R, Bhaskar AS, Lakshmana Rao PV. Oxidative stress induction by T-2 toxin causes DNA damage and triggers apoptosis via caspase pathway in human cervical cancer cells. *Toxicology* 2009; 262: 153-61.
- [433] Wu J, Jing L, Yuan H, Peng SQ. T-2 toxin induces apoptosis in ovarian granulosa cells of rats through reactive oxygen species-mediated mitochondrial pathway. *Toxicol Lett* 2011; 202: 168-77.
- [434] Lim SC, Duong HQ, Choi JE, *et al.* Lipid raft-dependent death receptor 5 (DR5) expression and activation are critical for ursodeoxycholic acid-induced apoptosis in gastric cancer cells. *Carcinogenesis* 2011; 32: 723-31.
- [435] Murata M, Kawanishi S. Oxidative DNA damage by vitamin A and its derivative via superoxide generation. *J Biol Chem* 2000; 275: 2003-8.
- [436] Klamt F, Dal Pizzol F, Gelain DP, *et al.* Vitamin A treatment induces apoptosis through an oxidant-dependent activation of the mitochondrial pathway. *Cell Biol Int* 2008; 32: 100-6.
- [437] Gasowska-Giszczyk U, Darmochwal-Kolarz D, Kwasniewska A, Dziubinska-Parol I, Rolinski J, Oleszczuk J. Apoptosis of HeLa cell lines incubated with retinol. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2005; 119: 119-22.
- [438] Chen Q, Espey MG, Sun AY, *et al.* Pharmacologic doses of ascorbate act as a prooxidant and decrease growth of aggressive tumor xenografts in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; 105: 11105-9.
- [439] Du J, Martin SM, Levine M, *et al.* Mechanisms of ascorbate-induced cytotoxicity in pancreatic cancer. *Clin Cancer Res* 2010; 16: 509-20.
- [440] Chen WJ, Huang YT, Wu ML, Huang TC, Ho CT, Pan MH. Induction of apoptosis by vitamin D2, ergocalciferol, via reactive oxygen species generation, glutathione depletion, and caspase activation in human leukemia Cells. *J Agric Food Chem* 2008; 56: 2996-3005.
- [441] Koren R, Hadari-Naor I, Zuck E, Rotem C, Liberman UA, Ravid A. Vitamin D is a prooxidant in breast cancer cells. *Cancer Res* 2001; 61: 1439-44.
- [442] Narvaez CJ, Welsh J. Role of mitochondria and caspases in vitamin D-mediated apoptosis of MCF-7 breast cancer cells. *J Biol Chem* 2001; 276: 9101-7.
- [443] Shibayama-Imazu T, Sonoda I, Sakairi S, *et al.* Production of superoxide and dissipation of mitochondrial transmembrane potential by vitamin K2 trigger apoptosis in human ovarian cancer TYK-nu cells. *Apoptosis* 2006; 11: 1535-43.
- [444] Shibayama-Imazu T, Aiuchi T, Nakaya K. Vitamin K2-mediated apoptosis in cancer cells: role of mitochondrial transmembrane potential. *Vitam Horm* 2008; 78: 211-26.
- [445] Jamison JM, Gilloteaux J, Nassiri MR, Venugopal M, Neal DR, Summers JL. Cell cycle arrest and autophagy in a human bladder carcinoma cell line following Vitamin C and Vitamin K3 treatment. *Biochem Pharmacol* 2004; 67: 337-51.
- [446] Akiyoshi T, Matzno S, Sakai M, Okamura N, Matsuyama K. The potential of vitamin K3 as an anticancer agent against breast cancer that acts via the mitochondria-related apoptotic pathway. *Cancer Chemother Pharmacol* 2009; 65: 143-50.

Received: ??????????

Revised: ??????????

Accepted: ??????????

### **3. ANTECEDENTES**

### 3. ANTECEDENTES

#### 3.3.2.2. Utilización de inhibidores de glicólisis para matar de forma selectiva células cancerosas.

Todas las células requieren ATP para poder llevar a cabo los procesos celulares, incluyendo la división celular. La mayoría de las moléculas del ATP son producidas en la mitocondria a través de la fosforilación oxidativa (OXPHOS), que es un proceso de oxidación de NADH y FADH<sub>2</sub> (generados durante la glicólisis, la oxidación de los ácidos grasos y el ciclo de ácidos tricarboxílicos) acoplado a la fosforilación del ADP hasta ATP, siendo el O<sub>2</sub> el aceptor final de electrones. Las células también pueden producir ATP mediante la glicólisis, que tiene lugar en el citosol y no requiere oxígeno. La glicólisis es una ruta catabólica de la glucosa en la cual una molécula de glucosa es transformada en dos moléculas de piruvato, resultante en la producción de ATP y en el consumo de NAD<sup>+</sup>. El piruvato generado puede ser convertido a lactato mediante la lactato deshidrogenasa, regenerando en el proceso al NAD<sup>+</sup> que es necesario para poder repetir el proceso de glicólisis. Porque la OXPHOS es sobre 10 veces más efectiva que la glicólisis generando ATP, es comprensible que las células generen ATP mayoritariamente a través de OXPHOS cuando los niveles de oxígeno son los adecuados. Mientras que en ausencia de oxígeno, las células dependerán de la glicólisis para la generación de ATP. Esto se conoce como efecto Pasteur<sup>39</sup>, en honor a Pasteur que observó que la glicólisis solamente se encontraba activa en ausencia de oxígeno.

Para la generación de energía, las células deben tomar nutrientes desde la sangre. Estos nutrientes también son utilizados para la síntesis de macromoléculas y componentes celulares requeridos para la formación de las nuevas células durante la división celular. Dentro de los nutrientes más importantes para la proliferación celular se encuentra la glucosa porque su metabolización a través de la glicólisis es requerida para la obtención de numerosos precursores de otras macromoléculas. Por ello, no es de extrañar que las células cancerosas (y células normales con elevada proliferación) tengan un elevado ritmo de absorción de glucosa y de glicólisis, debido a la elevada tasa de proliferación de la que se caracterizan. Sin embargo, junto a los nutrientes, a las células cancerosas les llega también oxígeno, el cual según el efecto Pasteur debería inactivar a la glicólisis. Esto implica que la proliferación celular se vería comprometida si la glicólisis estuviese siempre inhibida en presencia de oxígeno como explica el efecto Pasteur. Esta activación de la glicólisis en presencia de oxígeno es lo que se conoce como glicólisis aeróbica o efecto Warburg. El mecanismo de cómo las células cancerosas pueden cambiar la OXPHOS a glicólisis aeróbica no está muy claro todavía y existen numerosas posibles explicaciones<sup>31</sup>.

Otto Warburg fue el primero en describir esta activación de la glicólisis en las células cancerosas<sup>21</sup>. Él explicaba que el cambio de OXPHOS a glicólisis aeróbica se debía a que las células cancerosas presentaban daños irreversibles en las proteínas que conforman la

### 3. ANTECEDENTES

OXPHOS<sup>21</sup>. Esta hipótesis solamente puede explicar ese cambio metabólico en algunos tipos de cáncer que han demostrado tener disminuida la funcionalidad de la OXPHOS por presentar mutaciones en el ADN mitocondrial, con lo que tienen disminuida la expresión o presentan defectos en alguno de los componentes de la OXPHOS, dependiendo de la glicólisis para la producción de energía<sup>40</sup>. Sin embargo, hay otros tumores cuyas células han demostrado conservar la funcionalidad de OXPHOS, aunque ésta se encuentra disminuida<sup>27,29</sup>. Pero independientemente del estado funcional de OXPHOS, el 60% de la energía en las células cancerosas proviene de la glicólisis aeróbica.

La elección de la glicólisis como fuente principal de energía puede ser debido a que la glicólisis genera ATP de forma más rápida que la OXPHOS, permitiendo mantener la alta demanda energética de las células cancerosas. Aunque la glicólisis es menos eficiente en la producción de moléculas de ATP que la OXPHOS, esta desventaja es compensada por las células cancerosas con una elevada absorción de glucosa<sup>26-28</sup>. Esta elevada absorción de glucosa se ha visto asociada con mutaciones ocurridas en las células cancerosas<sup>29</sup>. Estas mutaciones también han sido relacionadas con un aumento en la expresión de enzimas glicolíticas. Tanto el aumento de la absorción de glucosa como de la expresión de enzimas glicolíticas originan la activación de la glicólisis. Entre algunas de las mutaciones genéticas que pueden originar este cambio metabólico se encuentran:

- \* Activación de la vía fosfoinositol 3-quinasa (PI3K) por la mutación en genes supresores de tumores que en condiciones normales la inactivarían. La activación de esta vía no solo va a inducir la generación de señales de crecimiento, sino que va a aumentar la expresión de transportadores de glucosa y de enzimas participantes en la glicólisis, con la consecuente activación de la glicólisis.

- \* Activación del factor de transcripción inducible por hipoxia (HIF1). Este factor en condiciones normales solamente se ve activado en presencia de hipoxia, situación en la que se pueden encontrar muchos tumores en algún momento de su desarrollo. Algunos estudios proponen que la activación de la glicólisis se debe a una adaptación a las condiciones de hipoxia durante las fases iniciales del desarrollo del tumor, permitiendo la producción de ATP en ausencia de oxígeno. Sin embargo, ha sido demostrado que HIF1 también puede ser activado en condiciones de normoxia por determinados oncogenes. La activación de HIF1 va a inducir la expresión de genes que codifican transportadores de glucosa y/o enzimas glicolíticas, favoreciendo la activación de la glicólisis.

- \* Pérdida del gen p53. Este gen no solamente está involucrado en la respuesta a la reparación del daño en el ADN e inducción de apoptosis, sino que es capaz de regular la glicólisis por la inactivación de la vía PI3K.



### 3. ANTECEDENTES

\* Inactivación de la proteína quinasa activada por AMP (AMPK) por mutaciones en el gen. La AMPK es un regulador esencial del estado energético que actúa inhibiendo el crecimiento celular cuando el ratio AMP/ATP está aumentado, como es en el caso de estrés metabólico por falta de nutrientes.

En la activación de la glicólisis también se ha visto que el pH intracelular juega un papel fundamental<sup>41,42</sup>. Cuando se activa la glicólisis, una molécula de glucosa es degradada hasta dos moléculas de piruvato. En presencia de oxígeno, ese piruvato entraría en la mitocondria en donde la Piruvato deshidrogenasa (PDH) lo transformaría en acetil-CoA, permitiendo que entre en el ciclo de los ácidos tricarboxílicos (CAT) y generando los sustratos de la OXPHOS. Sin embargo, las células cancerosas han demostrado tener un elevado nivel de Proteína deshidrogenasa quinasa (PDK), enzima inhibidora de PDH, como resultado de la activación del HIF1. De esta forma, en las células cancerosas el piruvato no puede entrar a formar parte del CAT y es transformado por la lactato deshidrogenasa en lactato<sup>25,29</sup>. Este lactato disminuiría el pH intracelular, que podría llegar a inducir una parada del ciclo celular o incluso inducir apoptosis. Sin embargo, las células cancerosas tienen aumentada la expresión y actividad de transportadores de membrana encargados de expulsar protones y lactato fuera de la célula (como la bomba  $H^+$ -ATPasa, intercambiadores de  $Na^+$ - $H^+$ , etc.), provocando una alcalinización del pH intracelular y una acidificación del pH extracelular<sup>41</sup>. La alcalinización del pH intracelular incrementa la proliferación celular, evita la apoptosis; mientras que la acidificación del pH extracelular favorece la invasión debido a que la acidez degrada la matriz extracelular, favorece la activación de proteasas que también contribuirán a la degradación de la matriz e impide la entrada de compuestos que sean bases débiles como algunos fármacos antineoplásicos (como doxorubicina, mitoxentrona y vincristina) provocando resistencias a estos fármacos. Por otra parte, la alcalinización del citosol también facilita que las células cancerosas mantengan activada la glicólisis. Durante la elaboración de esta tesis se ha realizado el trabajo titulado “*Role of the Intracellular pH in the Metabolic Switch between Oxidative Phosphorylation and Aerobic Glycolysis - Relevance to Cancer*” con el objetivo de conocer los motivos por los que la alcalinización del pH intracelular favorece el fenotipo glicolítico. La OXPHOS depende de la diferencia de concentración de  $H^+$  entre la matriz mitocondrial y el espacio intermembrana de la mitocondria. En la membrana externa de la mitocondria existen unos canales de aniones dependientes de voltajes (VDAC). Si estos canales se encuentran abiertos, las concentraciones de  $H^+$  en el espacio intermembrana de la mitocondria y el citosol van a ser similares. Esto quiere decir que una alcalinización del citosol, como se ha comentado que ocurre en las células cancerosas por activación de la glicólisis, también disminuiría los  $H^+$  en el espacio intermembrana mitocondrial, con lo que la OXPHOS se vería reducida por la disminución del gradiente de  $H^+$ . Por otro lado, un pH alcalino del citosol también provocaría que la hexoquinasa



### 3. ANTECEDENTES

se uniera a los canales VDAC, impidiendo el funcionamiento normal de la mitocondria, con lo que la OXPHOS también quedaría reducida. Debido a esta disminución de la actividad de la OXPHOS, las células cancerosas deberían mantener activa la glicólisis para poder cubrir las necesidades energéticas. Además, la glicólisis también se vería estimulada por la activación de la fosfofructoquinasa, enzima clave en la regulación de la glicólisis, debido a la alcalinización intracelular. Por otra parte, el piruvato formado como producto de la glicólisis no podría penetrar en la mitocondria debido a la reducción del gradiente de  $H^+$ , el cual es necesario para el transporte de piruvato al interior de la mitocondria, con lo que el piruvato se acumularía en el citosol. Esta acumulación de piruvato activaría al HIF1 que aumentaría la expresión de transportadores de glucosa y enzimas glicolíticas, con lo que la glicólisis seguiría activa. Todos estos eventos podrían explicar que la alcalinización del citosol participe en mantener activa la glicólisis en las células cancerosas.

Está claro que una glicólisis activa permite a las células cancerosas poder mantener el estado energético y al aporte de los precursores necesarios para la biosíntesis de macromoléculas. Pero la glicólisis tiene otra función vital para las células cancerosas: el mantener la homeostasis del balance redox. Como se ha comentado en el apartado anterior, las células cancerosas presentan unos elevados niveles de EROs fruto de su elevado metabolismo celular. Aunque las EROs pueden inducir muerte celular, las células tumorales han desarrollado mecanismos para prevenir que las EROs alcancen niveles citotóxicos. La glicólisis forma parte de uno de estos mecanismos de defensa contra el estrés oxidativo. Por un lado, la activación de la glicólisis incrementa la formación de piruvato, el cual es un eficiente atrapador de peróxido de hidrógeno. Por otro lado, el metabolismo de la glucosa a través del ciclo de la pentosa fosfato va a regenerar NADPH desde  $NAD^+$ . La regeneración del NADPH es necesaria para la detoxificación de EROs a través de los sistemas de antioxidantes glutatión y tioredoxin (Figura 12)<sup>25</sup>.

Estas funciones de la glicólisis aeróbica explican su papel clave en el desarrollo del cáncer. La posible reversión metabólica de la glicólisis aeróbica a OXPHOS podría ser importante para el desarrollo de estrategias preventivas y terapéuticas contra el cáncer. Existen numerosos estudios en donde se ha visto que la utilización de inhibidores de la glicólisis disminuye la producción de ATP en las células cancerosas, induciendo la muerte celular<sup>25,43-45</sup>. Por otro lado, la combinación de inhibidores de glicólisis junto con agentes prooxidantes podría presentar sinergismo, potenciando el efecto citotóxico sobre células cancerosas<sup>25</sup>. Este sinergismo se debería a que la inhibición de la glicólisis podría hacer a las células cancerosas más susceptibles al aporte exógeno de EROs. Todo esto hace pensar que la inhibición de la glicólisis podría ser una herramienta útil en el tratamiento del cáncer.

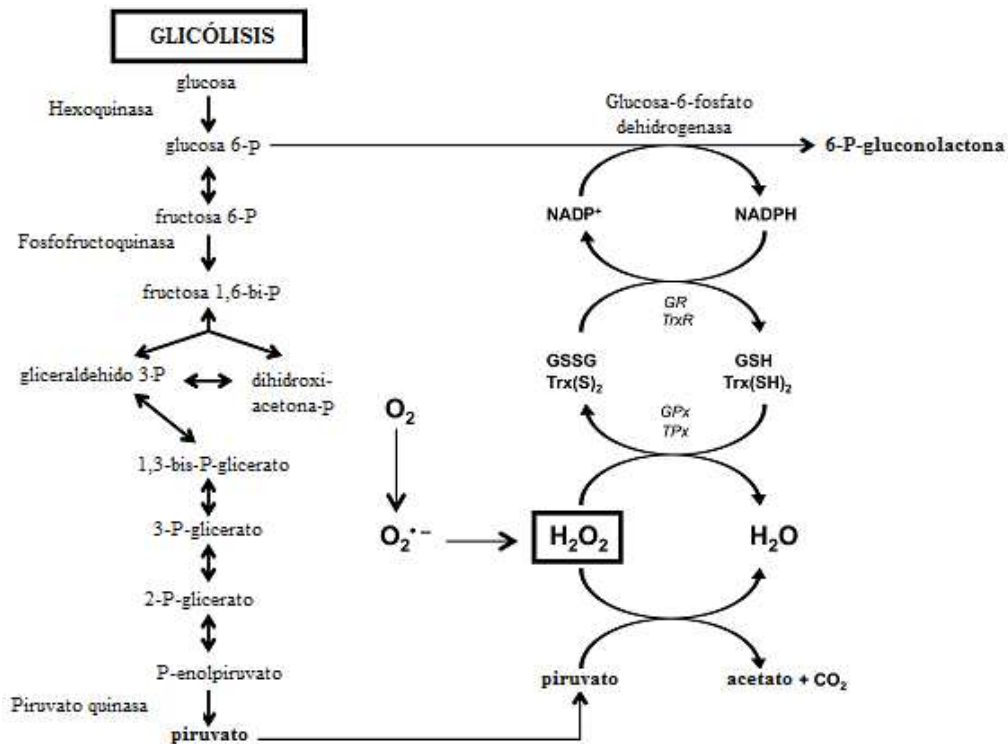


Figura 12. Papel de la glicólisis en la detoxificación de  $H_2O_2$ . La glicólisis ayudaría a detoxificar  $H_2O_2$  al incrementar las concentraciones de piruvato y por regeneración de los sistemas antioxidantes glutatión y tioredoxin. Fuente original: "López-Lázaro, M. A new view of carcinogenesis and an alternative approach to cancer therapy. Mol. Med. 2010, 16 (3-4); 144-153"<sup>25</sup>.

### **3. ANTECEDENTES**

# Role Of The Intracellular PH In The Metabolic Switch Between Oxidative Phosphorylation And Aerobic Glycolysis - Relevance To Cancer

## Abstract

Cellular energy in the form of ATP can be produced through oxidative phosphorylation and through glycolysis. Since oxidative phosphorylation requires oxygen and generates ATP more efficiently than glycolysis, it has been assumed for many years that the presence or absence of oxygen determines that cells generate energy through oxidative phosphorylation or through glycolysis. Although cells must activate glycolysis in the absence of oxygen to produce ATP, it is now accepted that they can activate both glycolysis and oxidative phosphorylation in the presence of oxygen. In fact, normal proliferating cells and tumor cells are known to have a high glycolytic activity in the presence of adequate oxygen levels, a phenomenon known as aerobic glycolysis or the Warburg effect. Recent observations have demonstrated that the activation of aerobic glycolysis plays a major role in carcinogenesis and tumor growth. Understanding the mechanisms involved in the metabolic switch between oxidative phosphorylation and aerobic glycolysis may therefore be important for the development of potential preventive and therapeutic interventions. In this article, we discuss the role of the intracellular pH in the metabolic switch between oxidative phosphorylation and aerobic glycolysis. We propose that, in the presence of adequate oxygen levels, the intracellular pH may play a key role in determining the way cells obtain energy, an alkaline pH driving aerobic glycolysis and an acidic pH driving oxidative phosphorylation.

## Introduction

Cells require energy in the form of adenosine-5-triphosphate (ATP) to carry out numerous cellular processes. Most ATP molecules are produced in the mitochondria through oxidative phosphorylation (oxphos), an oxygen-dependent process that couples the oxidation of NADH and FADH<sub>2</sub> with the phosphorylation of ADP to form ATP. Oxphos requires

oxygen because the electrons resulting from the oxidation of NADH and FADH<sub>2</sub> need to be ultimately accepted by oxygen. Cells can also produce ATP through glycolysis, which takes place in the cytosol and does not require oxygen. In the glycolytic process, one molecule of glucose is transformed into two molecules of pyruvate resulting in the production of ATP. This transformation consumes NAD<sup>+</sup>, which can be regenerated by the conversion of pyruvate to lactate. Because oxphos is over ten times more efficient than glycolysis in generating ATP, it is comprehensible that cells generate ATP through oxphos when the oxygen levels are adequate. This was first noted by Louis Pasteur in the late 19<sup>th</sup> century, who observed that the generation of ATP shifted from oxphos to glycolysis when the oxygen levels decreased (Pasteur effect) (1-3).

Several decades later the biochemist Otto Warburg first observed that cancer cells had increased glycolytic activity despite the presence of an adequate oxygen supply (4). This phenomenon, called aerobic glycolysis or Warburg effect, has repeatedly been observed and is currently used worldwide as a diagnostic tool to detect malignant tumors (Fluorodeoxyglucose - Positron Emission Tomography: FdG-PET) (5). It is important to mention that the metabolic switch from oxphos to aerobic glycolysis is not a unique feature of tumor cells, because it has also been observed in non-transformed proliferating cells (6-8). It is also important to note that, although normal proliferating cells and tumor cells activate aerobic glycolysis, these cells also rely on oxphos for their ATP production (4,9).

Although it is now accepted that the Warburg effect plays an important role in carcinogenesis and tumor growth, it is not clear why and how this phenomenon occurs. We have proposed previously that normal proliferating cells and tumor cells need to activate glycolysis despite the presence of oxygen in order to proliferate (10-12). Cell proliferation requires the synthesis of new macromolecules (e.g., nucleic acids, lipids, proteins) and glycolysis provides building blocks (e.g. glucose 6-phosphate, dihydroxyacetone phosphate, 3-phosphoglycerate, phosphoenolpyruvate,

pyruvate) that participate in the synthesis of these macromolecules. This means that cell proliferation would be compromised if glycolysis were always inhibited in the presence of oxygen, and can explain why tumor cells and normal proliferating cells activate glycolysis under aerobic conditions (10-12). As to how cells switch from oxphos to aerobic glycolysis, several mechanisms have been proposed (9,11). Less focus has been placed on how cells come back from aerobic glycolysis to oxphos, probably because it has been considered for some time that the Warburg effect was caused by irreversible damages to oxphos (4,13). Because aerobic glycolysis plays a key role in cancer development, understanding how cells switch from aerobic glycolysis to oxphos could be important for the development of potential preventive and therapeutic interventions. In this article, we discuss evidence that the cytosolic concentration of protons (intracellular pH) may play a key role in the metabolic switch between oxidative phosphorylation and aerobic glycolysis, an alkaline pH driving aerobic glycolysis and an acidic pH driving oxidative phosphorylation.

#### **An alkaline intracellular pH may drive the metabolic switch from oxidative phosphorylation to aerobic glycolysis**

In the process of oxphos, high-energy electrons from NADH and FADH<sub>2</sub> are passed along the electron-transport chain, located in the inner mitochondrial membrane, to oxygen (illustration 1). This electron transport drives protons (H<sup>+</sup>) pumping from the mitochondrial matrix to the intermembrane space, which generates an electrochemical H<sup>+</sup> gradient across the inner mitochondrial membrane. This electrochemical H<sup>+</sup> gradient (or proton motive force) drives H<sup>+</sup> entry into the mitochondrial matrix through ATP synthase, a transmembrane protein complex that uses the energy of the H<sup>+</sup> flow to synthesize ATP from ADP and inorganic phosphate (P<sub>i</sub>). Therefore, as shown in illustration 1, ATP generation through oxphos ultimately depends on an electrochemical H<sup>+</sup> gradient across the inner mitochondrial membrane. This H<sup>+</sup> gradient also drives pyruvate and P<sub>i</sub> transport into the mitochondrial matrix (2).

The outer mitochondrial membrane contains transport proteins called voltage dependent anion channels (VDAC), or mitochondrial porins, which form large channels through the lipid bilayer (2,14-16). When VDACs are open, the intermembrane space and the cytosol are supposed to be chemically equivalent with respect to the small molecules they contain, including H<sup>+</sup> (2). This means that a decrease in the cytosolic concentration of H<sup>+</sup> (intracellular alkalinization) would

decrease the concentration of H<sup>+</sup> in the mitochondrial intermembrane space. This would reduce the electrochemical H<sup>+</sup> gradient across the inner mitochondrial membrane and would repress oxphos even in the presence of adequate oxygen levels (illustration 1) (2,17).

It is important to note that, when VDACs are closed, the concentration of protons in the mitochondrial intermembrane space may be rather different than that in the cytosol. Indeed, pH differences across the outer mitochondrial membrane have been measured in tumorigenic ECV304 cells (18,19). Evidence indicates that hexokinase can repress oxphos in tumor cells by binding to VDAC and inducing its closure (9,14-16,20). Interestingly, hexokinase binding to mitochondria is strongly dependent on the intracellular pH; an alkaline pH would increase hexokinase binding and activity (21), and would lead to VDAC closure and repression of mitochondrial activity (14). This supports the idea that intracellular alkalinization can repress oxphos.

In addition to repressing oxphos, a decrease in the cytosolic concentration of H<sup>+</sup> can stimulate glycolysis. The key glycolytic enzyme phosphofructokinase (PFK) is well-known to be repressed by ATP (2). Intracellular alkalinization-induced oxphos repression would decrease cellular ATP levels; this would release PFK inhibition by ATP and would increase glycolysis to compensate such ATP deficit. In addition, evidence indicates that intracellular alkalinization activates glycolysis by directly increasing the activity of PFK. The enzyme PFK is extremely sensitive to small changes in pH in the physiological range, a high pH increasing its activity (22,23). In fact, an increase in pH of 0.1-0.3 units can change the activity of PFK from an inactive form to a saturated state (22).

Although the activation of the enzyme PFK is fundamental for the activation of glycolysis, cells need to increase the expression of glucose transporters (e.g. GLUTs) and glycolytic enzymes (e.g. hexokinase, PFK, pyruvate kinase) to keep sustained glycolytic rates.

Hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) plays a key role in the transcription of genes that code for glucose transporters and glycolytic enzymes (24-27). Interestingly, it has been demonstrated that the glucose metabolite pyruvate increases HIF-1 activity under aerobic conditions by preventing HIF-1 degradation (28,29). As represented in illustration 2, the activation of glycolysis would increase the cellular levels of pyruvate. The reduction in the electrochemical H<sup>+</sup> gradient across the inner mitochondrial membrane induced by intracellular alkalinization would decrease pyruvate entry into the mitochondrial matrix, which would increase the

cytosolic concentrations of pyruvate further (illustration 1). The increased pyruvate levels in the cytosol would increase HIF-1 activity and the expression of glucose transporters and glycolytic enzymes, which would keep sustained glycolytic rates (28,29). Interestingly, HIF-1 activation can also induce oxphos repression (13,30). HIF-1 mediates the expression of pyruvate dehydrogenase kinase; this results in pyruvate dehydrogenase inhibition, decreased conversion of pyruvate to acetyl-CoA, reduced activity of the tricarboxylic acid cycle and subsequent oxphos repression (13,30).

Additional evidence supports the view that intracellular alkalinization can activate glycolysis in the presence of adequate oxygen levels (31-33). Experimental data have revealed that cancer cells, which are known to have high rates of aerobic glycolysis, have an increase in their intracellular pH of 0.13-0.45 units (7.12-7.65 compared with 6.99-7.20 in normal cells) (33,34). Growth factor-induced proliferation of normal cells has also been associated with intracellular alkalinization (mediated by the  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiporter) and with increased rates of aerobic glycolysis (31,35,36).

#### **An acidic intracellular pH may drive the metabolic switch from aerobic glycolysis to oxidative phosphorylation: relevance to cancer**

Since a decrease in the cytosolic concentration of  $\text{H}^+$  (intracellular alkalinization) may drive the metabolic switch from oxphos to aerobic glycolysis, one can expect that an increase in the cytosolic levels of  $\text{H}^+$  (intracellular acidification) can reverse this metabolic switch (illustration 2). It is well known that the activation of glycolysis produces  $\text{H}^+$  in the cytosol. Therefore, cells would come back from aerobic glycolysis to oxphos when the activation of glycolysis would lead to a concentration of  $\text{H}^+$  high enough to reverse the intracellular alkalinization. This increase in the cytosolic concentration of  $\text{H}^+$  would raise the electrochemical  $\text{H}^+$  gradient across the inner mitochondrial membrane, which would drive pyruvate and  $\text{P}_i$  entry into the matrix and would activate oxphos (illustration 1). This reduction in the intracellular pH would also inhibit glycolysis by directly and indirectly inhibiting PFK activity, and by reducing the expression of glucose transporters and glycolytic enzymes induced by pyruvate and mediated by HIF-1 (illustration 2).

Cancer cells are known to have increased glycolytic rates despite the presence of adequate oxygen levels. Since an increased glycolytic activity acidifies the cytosol and an acidic intracellular pH can drive the metabolic switch from aerobic glycolysis to oxphos, one could wonder why cancer cells keep increased

glycolytic activity instead of switching back to oxphos. It has recently been proven that tumor cells do not necessarily have irreversible damages to oxphos, as some cancer cells have been forced to switch from aerobic glycolysis to oxphos (13). Evidence indicates that tumor cells prevent cytosolic acidification by activating a number of transporters that extrude the protons produced during glycolysis (37). This active proton transport across the cellular membrane can explain the reversed intra-extracellular pH gradients found in cancer cells (31,37); experimental data have demonstrated that tumor cells have alkaline intracellular pH values (7.12–7.65 compared with 6.99–7.20 in normal tissues) and acidic interstitial extracellular pH values (6.2–6.9 compared with 7.3–7.4) (33,34). The increased activity of these  $\text{H}^+$  extruders seems to play a critical role in the maintenance of high rates of aerobic glycolysis in cancer cells. The inhibition of these transporters has already been proposed as an attractive anticancer strategy that could potentially be used in a wide range of cancer types (37,38). Inhibition of the sodium pump, e.g. by cardiac glycosides, may also interfere with proton extrusion in tumor cells and induce selective anticancer activity (39,40).

## **Conclusion**

Despite many decades of research, we still do not fully understand what makes cells choose between oxidative phosphorylation and glycolysis to produce energy. It is clear that cells must use glycolysis to produce energy when oxygen is not available. Here we have discussed that, in the presence of adequate oxygen levels, the intracellular pH may play a key role in determining the way cells obtain energy (illustration 3). This knowledge may be important for the development of potential cancer preventive and therapeutic interventions.

## **References**

1. Pasteur, L. (1861) Experiments and novel views on the nature of fermentation. *Comp. Rend. Acad. Sci.*, 89, 1260-1264.
2. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P (2002) *Molecular biology of the cell*. New York: Garland Publishing.
3. Berg J, Tymoczko J, Stryer L (2002) *Biochemistry*. New York: W. H. Freeman and Co.
4. Warburg, O. (1956) On the origin of cancer cells. *Science*, 123, 309-314.



5. Gatenby, R. A. and Gillies, R. J. (2004) Why do cancers have high aerobic glycolysis? *Nat. Rev. Cancer*, 4, 891-899.
6. Wang, T., Marquardt, C. and Foker, J. (1976) Aerobic glycolysis during lymphocyte proliferation. *Nature*, 261, 702-705.
7. Brand, K. A. and Hermfisse, U. (1997) Aerobic glycolysis by proliferating cells: a protective strategy against reactive oxygen species. *FASEB J.*, 11, 388-395.
8. Fox, C. J., Hammerman, P. S. and Thompson, C. B. (2005) Fuel feeds function: energy metabolism and the T-cell response. *Nat. Rev. Immunol.*, 5, 844-852.
9. Pedersen, P. L. (2007) Warburg, me and Hexokinase 2: Multiple discoveries of key molecular events underlying one of cancers' most common phenotypes, the "Warburg Effect", i.e., elevated glycolysis in the presence of oxygen. *J. Bioenerg. Biomembr.*, 39, 211-222.
10. Lopez-Lazaro, M. (2006) Does hypoxia really control tumor growth? *Cell Oncol.*, 28, 327-329.
11. Lopez-Lazaro, M. (2008) The Warburg effect: why and how do cancer cells activate glycolysis in the presence of oxygen? *Anticancer Agents Med. Chem.*, 8, 305-312.
12. Lopez-Lazaro, M. (2010) A new view of carcinogenesis and an alternative approach to cancer therapy. *Mol. Med.*, 16, 144-153.
13. Fantin, V. R., St Pierre, J. and Leder, P. (2006) Attenuation of LDH-A expression uncovers a link between glycolysis, mitochondrial physiology, and tumor maintenance. *Cancer Cell*, 9, 425-434.
14. Lemasters, J. J. and Holmuhamedov, E. (2006) Voltage-dependent anion channel (VDAC) as mitochondrial governor - thinking outside the box. *Biochim. Biophys. Acta*, 1762, 181-190.
15. Mannella, C. A. and Kinnally, K. W. (2008) Reflections on VDAC as a voltage-gated channel and a mitochondrial regulator. *J. Bioenerg. Biomembr.*, 40, 149-155.
16. Shoshan-Barmatz, V., De, P., V., Zweckstetter, M., Raviv, Z., Keinan, N. and Arbel, N. (2010) VDAC, a multi-functional mitochondrial protein regulating cell life and death. *Mol. Aspects Med.*, 31, 227-285.
17. Lopez-Lazaro, M. (2006) HIF-1: Hypoxia-inducible Factor or Dysoxia-inducible Factor? *FASEB J.*, 20, 828-832.
18. Porcelli, A. M., Ghelli, A., Zanna, C., Pinton, P., Rizzuto, R. and Rugolo, M. (2005) pH difference across the outer mitochondrial membrane measured with a green fluorescent protein mutant. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 326, 799-804.
19. Takahashi, K., Sawasaki, Y., Hata, J., Mukai, K. and Goto, T. (1990) Spontaneous transformation and immortalization of human endothelial cells. *In Vitro Cell Dev. Biol.*, 26, 265-274.
20. Mathupala, S. P., Ko, Y. H. and Pedersen, P. L. (2009) Hexokinase-2 bound to mitochondria: cancer's stygian link to the "Warburg Effect" and a pivotal target for effective therapy. *Semin. Cancer Biol.*, 19, 17-24.
21. Miccoli, L., Oudard, S., Sureau, F., Poirson, F., Dutrillaux, B. and Poupon, M. F. (1996) Intracellular pH governs the subcellular distribution of hexokinase in a glioma cell line. *Biochem. J.*, 313, 957-962.
22. Trivedi, B. and Danforth, W. H. (1966) Effect of pH on the kinetics of frog muscle phosphofructokinase. *J. Biol. Chem.*, 241, 4110-4112.
23. Erecinska, M., Deas, J. and Silver, I. A. (1995) The effect of pH on glycolysis and phosphofructokinase activity in cultured cells and synaptosomes. *J. Neurochem.*, 65, 2765-2772.
24. Semenza, G. L. (2003) Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nat. Rev. Cancer*, 3, 721-732.
25. Schofield, C. J. and Ratcliffe, P. J. (2004) Oxygen sensing by HIF hydroxylases. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 5, 343-354.
26. Seagroves, T. N., Ryan, H. E., Lu, H. et al. (2001) Transcription factor HIF-1 is a necessary mediator of the pasteur effect in mammalian cells. *Mol. Cell Biol.*, 21, 3436-3444.
27. Semenza, G. L. (2006) Development of novel therapeutic strategies that target HIF-1. *Expert. Opin. Ther. Targets*, 10, 267-280.
28. Lu, H., Forbes, R. A. and Verma, A. (2002) Hypoxia-inducible factor 1 activation by aerobic glycolysis implicates the Warburg effect in carcinogenesis. *J. Biol. Chem.*, 277, 23111-23115.
29. Lu, H., Dalgard, C., Mohyeldin, A., McFate, T., Tait, A. S. and Verma, A. (2005) Reversible inactivation of HIF-1 prolyl hydroxylases allows cell metabolism to control basal HIF-1. *J. Biol. Chem.*, 280, 41928-41939.
30. Papandreou, I., Cairns, R. A., Fontana, L., Lim, A. L. and Denko, N. C. (2006) HIF-1 mediates adaptation to hypoxia by actively downregulating mitochondrial oxygen consumption. *Cell Metab.*, 3, 187-197.
31. Harguindey, S., Orive, G., Luis, P. J., Paradiso, A. and Reshkin, S. J. (2005) The role of pH dynamics and the Na(+)/H(+) antiporter in the etiopathogenesis and treatment of cancer. Two faces of the same coin-one single nature. *Biochim. Biophys. Acta*, 1756, 1-24.
32. Reshkin, S. J., Bellizzi, A., Caldeira, S. et al. (2000) Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger-dependent intracellular alkalization is an early event in malignant transformation and plays an essential role in the development of subsequent transformation-associated phenotypes. *FASEB J.*, 14, 2185-2197.
33. Cardone, R. A., Casavola, V. and Reshkin, S. J.

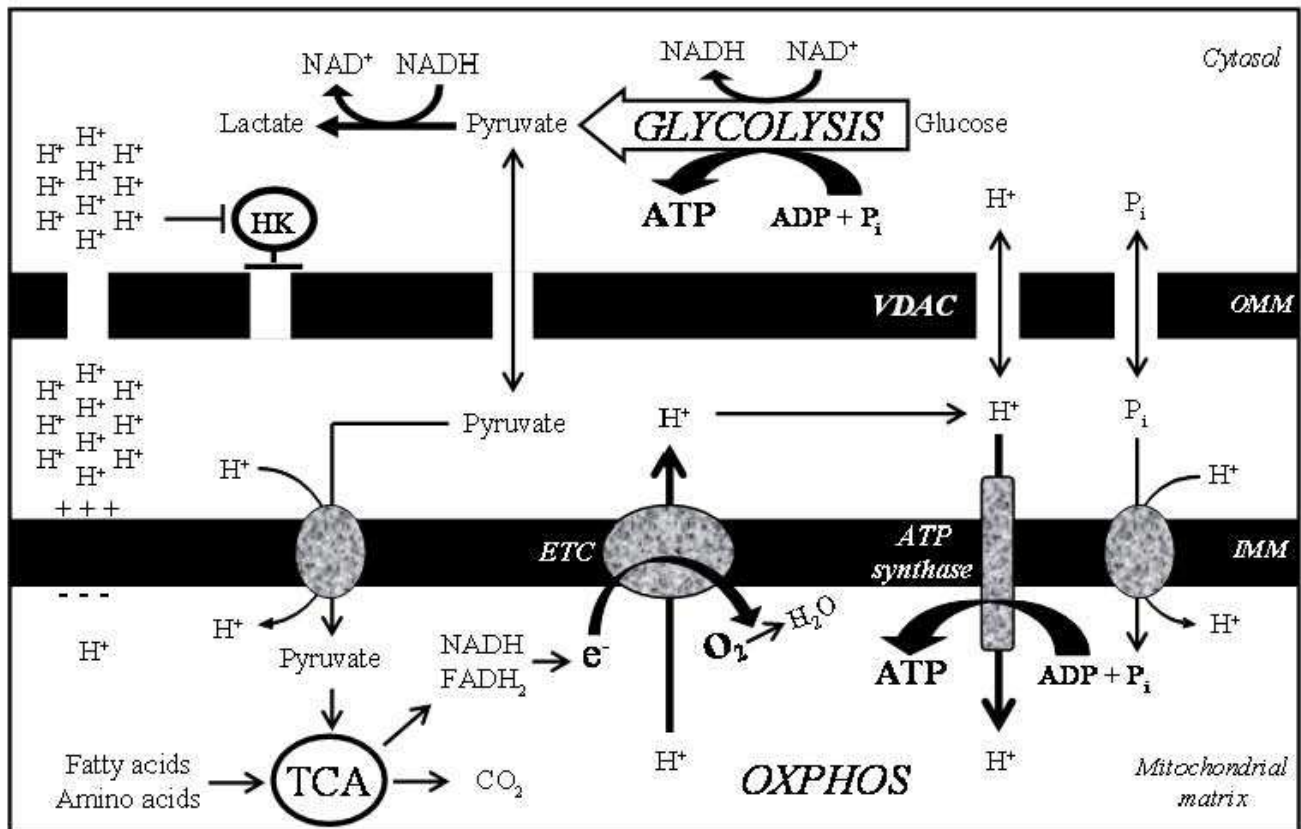


- (2005) The role of disturbed pH dynamics and the Na<sup>(+)</sup>/H<sup>(+)</sup> exchanger in metastasis. *Nat. Rev. Cancer*, 5, 786-795.
34. Gillies, R. J., Raghunand, N., Karczmar, G. S. and Bhujwala, Z. M. (2002) MRI of the tumor microenvironment. *J. Magn Reson. Imaging.*, 16, 430-450.
35. Whetton, A. D., Vallance, S. J., Monk, P. N., Cragoe, E. J., Dexter, T. M. and Heyworth, C. M. (1988) Interleukin-3-stimulated haemopoietic stem cell proliferation. Evidence for activation of protein kinase C and Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange without inositol lipid hydrolysis. *Biochem. J.*, 256, 585-592.
36. Bauer, D. E., Harris, M. H., Plas, D. R. et al. (2004) Cytokine stimulation of aerobic glycolysis in hematopoietic cells exceeds proliferative demand. *FASEB J.*, 18, 1303-1305.
37. Huber, V., De Mito, A., Harguindey, S. et al. (2010) Proton dynamics in cancer. *J. Transl. Med.*, 8, 57.
38. Harguindey, S., Arranz, J. L., Wahl, M. L., Orive, G. and Reshkin, S. J. (2009) Proton transport inhibitors as potentially selective anticancer drugs. *Anticancer Res.*, 29, 2127-2136.
39. Lopez-Lazaro, M., Pastor, N., Azrak, S. S., Ayuso, M. J., Austin, C. A. and Cortes, F. (2005) Digitoxin inhibits the growth of cancer cell lines at concentrations commonly found in cardiac patients. *J Nat. Prod.*, 68, 1642-1645.
40. Lopez-Lazaro, M. (2007) Digitoxin as an anticancer agent with selectivity for cancer cells: possible mechanisms involved. *Expert. Opin. Ther. Targets*, 11, 1043-1053.

## Illustrations

### Illustration 1

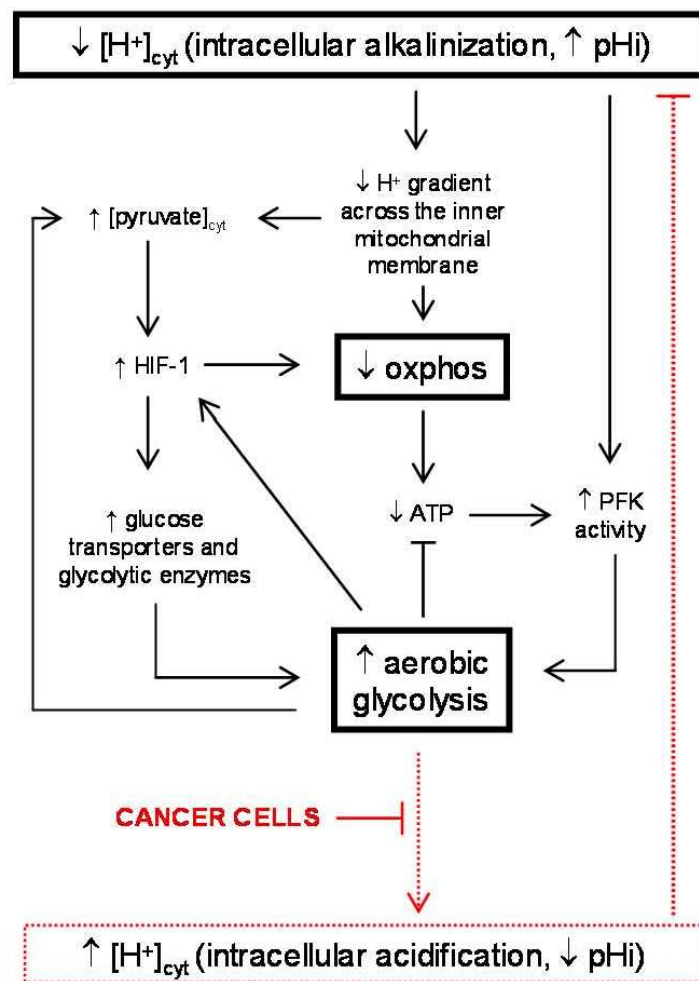
Repression of oxidative phosphorylation (oxphos) by intracellular alkalization.



The outer mitochondrial membrane (OMM) contains voltage dependent anion channels (VDAC) that make this membrane permeable to H<sup>+</sup>. A decrease in the cytosolic concentration of H<sup>+</sup> (intracellular alkalization) results in a reduction in the concentration of H<sup>+</sup> in the intermembrane space. This decreases the electrochemical H<sup>+</sup> gradient across the inner mitochondrial membrane (IMM) and reduces H<sup>+</sup> entry into the matrix through ATP synthase (as well as pyruvate and P<sub>i</sub> transport into the matrix), therefore reducing ATP synthesis through oxphos. Intracellular alkalization can also repress oxphos by inducing hexokinase (HK) binding to VDAC, which can induce VDAC closure and mitochondrial activity repression (see text for details). ETC: electron transport chain; TCA: tricarboxylic acid cycle.

## Illustration 2

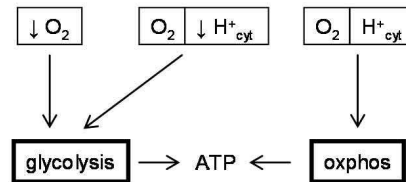
Role of the intracellular pH in the metabolic switch between oxidative phosphorylation and aerobic glycolysis.



Intracellular alkalization can activate glycolysis by directly and indirectly increasing the activity of the enzyme phosphofructokinase (PFK). An alkaline intracellular pH can also keep sustained glycolytic rates by increasing the expression of glucose transporters and glycolytic enzymes; this effect can be induced by an increase in the cytosolic concentrations of pyruvate and mediated by the activation of the hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1). Intracellular acidification caused by accumulation of glycolytic protons in the cytosol can reverse this metabolic switch. Tumor cells keep sustained rates of aerobic glycolysis instead of coming back to oxphos because they avoid cytosolic acidification e.g. by activating a number of transporters that pump the protons produced during glycolysis out of the cell (see text for further details).

#### Illustration 3

The cytosolic concentration of  $H^+$  (intracellular pH) may play a key role in determining the way cells obtain energy in the presence of adequate oxygen levels.



This figure represents in a simplified manner that cells need to activate glycolysis to generate ATP when the levels of oxygen are reduced or when the levels of oxygen are adequate but the cytosolic concentration of  $H^+$  is reduced (intracellular alkalization).

#### **4. OBJETIVO**

#### **4. OBJETIVO**

#### **4. OBJETIVO**



#### **4. OBJETIVO**

La gran mayoría de las muertes causadas por el cáncer se producen en pacientes con metástasis debido a que los fármacos utilizados en el tratamiento de estos pacientes tienen poca capacidad para matar células cancerosas de forma selectiva. El principal objetivo de este trabajo es la búsqueda de nuevos fármacos anticancerosos selectivos mediante la utilización de líneas celulares cancerosas y no cancerosas. Para esta búsqueda se han seguido varias estrategias basadas fundamentalmente en la utilización de los defectos de reparación del daño en el ADN de las células cancerosas y en la explotación de sus alteraciones metabólicas.

#### **4. OBJETIVO**

## **5. MATERIALES Y MÉTODOS**

## **5. MATERIALES Y MÉTODOS**

## **5. MATERIALES Y MÉTODOS**

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1. COMPUESTOS EVALUADOS.

En esta tesis se evaluó la posible actividad anticancerosa selectiva de más de 100 compuestos de distinta naturaleza. Los compuestos cuyos resultados son presentados en esta tesis se encuentran recogidos en la Tabla 1. En dicha tabla también es recogido el disolvente utilizado para preparar la disolución inicial de los compuestos. En aquellos compuestos en los que se utilizó dimetilsulfóxido (DMSO) para la elaboración de dicha disolución inicial, la concentración de DMSO nunca llegó a ser más alta del 1% cuando se utilizaron para el tratamiento de células.

Nombre	Fuente	Disolvente
Peróxido de hidrógeno (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	Panreac	Medio
Camptotecina (Cpt)	Sigma	DMSO
5-fluorouracilo (5-FU)	Sigma	DMSO
Oxaliplatino	Sigma	DMSO
Cisplatino	Sigma	DMSO
Hidroxiurea	Sigma	DMSO
Etopósido (Etop)	Sigma	DMSO
Fenilglioxal (FG)	Fluka	DMSO
Ácido clorogénico	Sigma	Medio
2-H-piran-2-ona (2-pirona)	Fluka	Medio
γ-crotonolactona (2-furanona)	Fluka	Medio
Dicloroacetato (DCA)	Sigma	Medio
2-deoxiglucosa (2DG)	Sigma	Medio
Bromopiruvato (BrP)	Sigma	Medio
Digoxina	Sigma	DMSO
Digoxina	Sigma	DMSO
Ouabaina	Sigma	DMSO
Pirogalol	Sigma	DMSO
Ácido gálico	Sigma	DMSO
Ácido ascórbico (Vitamina C)	Sigma	Medio
Curcumina	Sigma	DMSO
Miricetina	Sigma	DMSO
Resveratrol	Sigma	DMSO
Hidroxitirosol	Aislamiento a partir de aguas residuales de aceite oliva comercial <sup>46</sup>	DMSO
Etil hidroxitirosil éter	Sintetizado <sup>46</sup>	DMSO
Butil hidroxitirosil éter	Sintetizado <sup>46</sup>	DMSO
Hexil hidroxitirosil éter	Sintetizado <sup>46</sup>	DMSO
Octil hidroxitirosil éter	Sintetizado <sup>46</sup>	DMSO
Decil hidroxitirosil éter	Sintetizado <sup>47</sup>	DMSO
Dodecil hidroxitirosil éter (HTDE)	Sintetizado <sup>46</sup>	DMSO
Hexadecil hidroxitirosil éter	Sintetizado <sup>47</sup>	DMSO
N-farnesil-n'-(4-nitrofenil) tiourea (45)	Sintetizado <sup>48</sup>	DMSO
N-farnesil-N'-(3-nitrofenil) tiourea (46)	Sintetizado <sup>48</sup>	DMSO
N-farnesil-n'-(4-trifluorometil)fenil tiourea (47)	Sintetizado <sup>48</sup>	DMSO
N-(4-cianofenil)-N'-farnesil tiourea (50)	Sintetizado <sup>48</sup>	DMSO

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

N-farnesil-n'-(4-nitrofenil) urea (85)	Sintetizado <sup>48</sup>	DMSO
(2R)-2,3-Epoxipropil 4,6-O-(S)-bencilideno-β-D-galactopiranosido (32)	Sintetizado <sup>49</sup>	DMSO
(2S,3S)-2,3-Epoxidecil 4,6-O-(S)-bencilideno-β-D-galactopiranosido (35)	Sintetizado <sup>49</sup>	DMSO
(2R)-2,3-Epoxi-2-metilpropil 4,6-O-(S)-bencilideno-β-D-galactopiranosido (37)	Sintetizado <sup>49</sup>	DMSO
(2S,3S)-2,3-Dihidroxidecenil 4,6-O-(S)-Bencilideno-β-D-galactopiranosido (27)	Sintetizado <sup>50</sup>	DMSO
(2R)-2,3-Dihidroxi-2-metilpropil 2-Acetamido-4,6-O-(R)-bencilideno-2-deoxi-β-D-glucopiranosido (36)	Sintetizado <sup>50</sup>	DMSO
(2S)-3-Capriloiloxi-2-hidroxi-2-metilpropil 2-Acetamido-2-deoxi-β-D-glucopiranosido (58)	Sintetizado <sup>50</sup>	DMSO
(2S)-2-Hidroxi-2-metil-2-palmitoiloxipropil 2-Acetamido-2-deoxi-β-D-glucopiranosido (59)	Sintetizado <sup>50</sup>	DMSO
(2S)-2-Hidroxi-2-metil-3-oleoiloxipropil 2-Acetamido-2-deoxi-β-D-glucopiranosido (60)	Sintetizado <sup>50</sup>	DMSO
(2R)-2-Hidroxi-2-metil-3-palmitamidopropil 2-Acetamido-2-deoxi-β-D-glucopiranosido (63)	Sintetizado <sup>50</sup>	DMSO
2-Metil-2,3-[N-(4-metilbencenosulfonil)imino]propil 2,3-di-O-bencil-4,6-O-(S)-bencilideno-β-D-galactopiranosido (22)	Sintetizado*	DMSO
2,3-[N-(4-metilbencenosulfonil)imino]propil 2,3-di-O-bencil-4,6-O-(S)-bencilideno-β-D-galactopiranosido (23)	Sintetizado*	DMSO
2-Metil-2,3-[N-(4-metilbencenosulfonil)imino]propil 4,6-O-(S)-bencilideno-β-D-galactopiranosido (24)	Sintetizado*	DMSO
3-Metil-2,3-[N-(4-metilbencenosulfonil)imino]butil 4,6-O-(S)-bencilideno-β-D-galactopiranosido (25)	Sintetizado*	DMSO
3-Metil-2,3-[N-(4-metilbencenosulfonil)imino]butil 2,3-di-O-bencil-4,6-O-(S)-bencilideno-β-D-galactopiranosido (28)	Sintetizado*	DMSO
2,3-[N-(4-metilbencenosulfonil)imino]decil 3-O-bencil-4,6-O-(S)-bencilideno-β-D-galactopiranosido (29)	Sintetizado*	DMSO
2,3-[N-(4-metilbencenosulfonil)imino]butil 4,6-O-(S)-bencilideno-β-D-galactopiranosido (30)	Sintetizado*	DMSO
2,3-[N-(4-metilbencenosulfonil)imino]butil 2,3-di-O-bencil-4,6-O-(S)-bencilideno-β-D-galactopiranosido (31)	Sintetizado*	DMSO
2,3-[N-(4-metilbencenosulfonil)imino]-2-fenilpropil 2,3-di-O-bencil-4,6-O-(S)-bencilideno-β-D-galactopiranosido (47)	Sintetizado*	DMSO
2,3-[N-(4-metilbencenosulfonil)imino]-2-propilpropil 2,3-di-O-bencil-4,6-O-(S)-bencilideno-β-D-galactopiranosido (48)	Sintetizado*	DMSO
2,3-[N-(4-metilbencenosulfonil)imino]-2-nonilpropil 2,3-di-O-bencil-4,6-O-(S)-bencilideno-β-D-galactopiranosido (49)	Sintetizado*	DMSO
2,3-[N-(4-metilbencenosulfonil)imino]-2-tetradecilpropil 2,3-di-O-bencil-4,6-O-(S)-bencilideno-β-D-galactopiranosido (50)	Sintetizado*	DMSO
3-Dodecilamino-2-(4-metilbencenosulfonamida)propil 2,3-di-O-bencil-4,6-O-(S)-bencilideno-β-D-galactopiranosido (51)	Sintetizado*	DMSO
3-(4-Hidroxietilpiperazilmetil)-2-(4-metilbencenosulfonamida)hexadecil 2,3-di-O-bencil-4,6-O-(S)-bencilideno-β-D-galactopiranosido (52)	Sintetizado*	DMSO
Sulforafano	Sigma	DMSO
Sulforafano.42	Sintetizado <sup>51</sup>	DMSO
Sulforafano.52	Sintetizado <sup>51</sup>	DMSO



## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

Sulforafano.58	Sintetizado <sup>51</sup>	DMSO
Sulforafano.71	Sintetizado <sup>51</sup>	DMSO
Sulforafano.72	Sintetizado <sup>51</sup>	DMSO
Sulforafano.119	Sintetizado <sup>51</sup>	DMSO
CP-96345	Sigma	DMSO
INKA1(R)	Sintetizado**	DMSO
INKA1.AcF3	Sintetizado**	DMSO
INKA1.ona	Sintetizado**	DMSO
INKA1(S).Ac	Sintetizado**	DMSO
INKA2(S)	Sintetizado**	DMSO
INKA2(R)	Sintetizado**	DMSO
INKA3J(S)	Sintetizado**	DMSO
INKA3(R)	Sintetizado**	DMSO
INKA9	Sintetizado**	DMSO
INKA.9	Sintetizado**	DMSO
INKA.11	Sintetizado**	DMSO
INKA.23	Sintetizado**	DMSO
INKA.57	Sintetizado**	DMSO
INKA.59	Sintetizado**	DMSO
INKA.85	Sintetizado**	DMSO
INKA.116	Sintetizado**	DMSO
INKB21c	Sintetizado**	DMSO
INKB21d	Sintetizado**	DMSO
INKB30A	Sintetizado**	DMSO
INKB30B	Sintetizado**	DMSO
INKB72	Sintetizado**	DMSO
INKB117	Sintetizado**	DMSO
INKB222A	Sintetizado**	DMSO
INKB222B	Sintetizado**	DMSO
INKB300a	Sintetizado**	DMSO
INKB300b	Sintetizado**	DMSO
Café soluble	Comercial	Medio
Café verde soluble	Comercial	Medio
Té verde	Extracto***	Medio
<i>Nerium oleander</i> (NOE)	Extracto***	DMSO

Tabla 1. Compuestos cuya actividad anticancerosa ha sido evaluada en esta tesis.

\*Síntesis realizada por el grupo de investigación de los Drs. Vega Pérez e Iglesias Guerra. \*\* Síntesis realizada por el grupo de investigación de la Dra. Fernández Fernández y por el grupo de investigación del Dr. Khair. \*\*\* La elaboración de los extractos se encuentra recogida en el apartado “5.2. PREPARACIÓN DE EXTRACTOS VEGETALES”.

### 5.2. PREPARACIÓN DE EXTRACTOS VEGETALES.

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

La elaboración de los extractos de *Nerium oleander* y té verde es detallada a continuación.

En junio del 2010 se recogieron hojas de un espécimen de *Nerium oleander* L. en Sevilla (coordenadas geográficas 37° 22' 16''N, 5° 59' 25''W). El espécimen fue identificado botánicamente por el Dr. García y se encuentra depositado con el número de referencia 278048 en el herbario del Departamento de Biología Vegetal y Ecología de la Facultad de Biología, Universidad de Sevilla. Para la elaboración del extracto, las hojas frescas trituradas se mezclaron con una solución hidroalcohólica (etanol y agua en proporción 1:1) mediante agitación y calor (60°C) durante 1 h en un baño de ultrasonidos. Los restos de hojas se eliminaron filtrando la solución con papel de filtro y el etanol se eliminó en un rotavapor. La solución acuosa final se liofilizó, obteniéndose un rendimiento de extracción del 2,3%.

El extracto de té verde se obtuvo tras la disolución de 15 gramos de té verde comercial con 150 ml de agua en ebullición y posterior extracción en un baño con ultrasonidos durante 10 minutos. La solución obtenida se filtró y se liofilizó. El rendimiento de extracción obtenido fue del 9%.

### 5.3. DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO EN HETERÓSIDOS CARDIOTÓNICOS.

El contenido de heterósidos cardiotónicos del extracto se determinó con la reacción de Kedde, técnica colorimétrica para la determinación de lactonas pentacíclicas insaturadas, como la 2-furanona que presentan los cardenólidos en su estructura. Esta técnica se basa en la reacción que ocurre entre el ácido 3,5-dinitrobenzoico y las lactonas pentacíclicas insaturadas, dando lugar a un producto coloreado (rojo-violeta) que puede ser cuantificado por la medición de la absorbancia a 540 nm. La mezcla reactiva se preparó en el momento de la determinación, siendo una solución al 3% de ácido 3,5-dinitrobenzoico en etanol mezclada en una proporción 1:1 con una solución de NaOH 2M. En una placa de 96 pocillos se añadieron 150 µl/pocillo del extracto o del compuesto control (la lactona 2-furarona). A cada pocillo se le adicionaron 100 µl de la mezcla reactiva y la placa se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente. Finalizado el tiempo de incubación, se midió la absorbancia a 540 nm en un espectrofotómetro lector de placas. Las absorbancias de distintas concentraciones de 2-furarona se utilizaron para elaborar una curva patrón. Basándose en esta curva patrón, se determinó el porcentaje de heterósidos cardiotónicos (cardenólidos) en el extracto. Este porcentaje se expresó como la media  $\pm$  SEM de tres ensayos independientes.

### 5.4. LÍNEAS CELULARES.

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

Para la realización de esta tesis se han utilizado las líneas celulares recogidas en la Tabla 2. En dicha tabla se encuentra recogido el nombre, tipo de célula, medio de cultivo y el origen de las células utilizadas.

Nombre	Tipo celular	Medio de cultivo	Fuente
MRC-5	Humanas no malignas de pulmón	DMEM	ECACC
A549	Humanas de adenocarcinoma de pulmón	DMEM	ECACC
MCF10	Humanas no malignas de mama	DMEM + HAM's F12 (1:1)	Dra. Daza Navarro y Dr. Ruano
MCF7	Humanas de adenocarcinoma de mama	DMEM	Dra. Daza Navarro y Dr. Ruano
VH10	Humanas no malignas de piel	DMEM	Dr. Helleday
UACC-62	Humanas de melanoma	DMEM	ATCC
K562	Humanas de leucemia mieloide crónica	RPMI	ECACC
HT29	Humanas de adenocarcinoma colorrectal	DMEM	Dra. Motilva
HTC116	Humanas de carcinoma colorrectal (deficientes en MMR)	DMEM	Dr. Orta
AA8	Ovario de hámster chino	DMEM o McCoy's	ECACC
EM9	AA8 mutadas en XRCC1 (deficientes en reparación por escisión de bases)	DMEM o McCoy's	Dr. Helleday
EM9-V	AA8 mutadas en XRCC1 con un vector vacío	DMEM	Dr. Helleday
EM9-XH	EM9 complementadas con el gen XRCC1	DMEM	Dr. Helleday
KO40	AA8 mutadas en FANCG (deficientes en vía anemia de fanconi)	McCoy's	Dr. Palitti
UV4	AA8 mutadas en XPF (deficientes en reparación por escisión de nucleótidos)	DMEM	Dr. Helleday
UV5	AA8 mutadas en XPD (deficientes en reparación por escisión de nucleótidos)	DMEM	Dr. Helleday
UV61	AA8 mutadas en CSB (deficientes en reparación por escisión de nucleótidos)	DMEM	Dr. Helleday
V3-3	AA8 mutadas en DNA-PK (deficientes en reparación por unión de extremos no homólogos)	DMEM	Dr. Helleday
VC8	Pulmón de hámster chino V79 mutadas en el gen BRCA2 (deficientes en recombinación homóloga)	DMEM	Dr. Helleday
VC8-B2	VC8 complementadas con el gen BRCA2	DMEM	Dr. Helleday
HTC116Ch3	HTC116 complementadas con el cromosoma 3 (contiene gen MLH1)	DMEM	Dr. Orta

Tabla 2. Líneas celulares utilizadas en esta tesis.

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

Todos los medios de cultivo utilizados se suplementaron con 2 mM de glutamina, 50 µg/ml penicilina, 50 µg/ml estreptomicina y 10% de suero fetal bovino. Una excepción fue el medio utilizado para el cultivo de las células MCF10 que fue una mezcla al 1:1 de medio DMEM y HAM's F12 suplementados con 2 mM de glutamina, 50 µg/ml penicilina, 50 µg/ml estreptomicina, 20 ng/ml factores crecimiento, 100 ng/ml toxina colérica, 10 µg/ml insulina, 500 ng/ml hidrocortisona y 5% suero de caballo.

Todas las líneas celulares fueron cultivadas a 37°C, 5% CO<sub>2</sub> y humedad controlada en un incubador.

Todos los productos utilizados para el cultivo celular se obtuvieron del laboratorio PAA, a excepción del medio para las MCF10 que fue cedido por la Dra. Daza Navarro.

### 5.5. ANÁLISIS DE LA CITOTOXICIDAD MEDIANTE EL ENSAYO MTT.

La citotoxicidad es la cualidad de un agente de inducir efectos tóxicos sobre células, que acabarán generando la inhibición de su crecimiento o la muerte. Una de las técnicas más utilizadas para la evaluación de la citotoxicidad es el ensayo MTT. Esta técnica se basa en la capacidad que tienen las células vivas para reducir el compuesto amarillo MTT ((bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio, Sigma) en sus mitocondrias a un compuesto coloreado púrpura-azulado e insoluble (formazan-MTT). Este compuesto es posteriormente solubilizado y cuantificado mediante absorbancia; a mayor absorbancia, mayor producción de formazan-MTT, por tanto, mayor número de células vivas<sup>52</sup>.

Este ensayo se llevó a cabo para estudiar la citotoxicidad de los compuestos evaluados durante esta tesis. Células en fase de crecimiento exponencial se sembraron en placas de 96 pocillos en una densidad entre 30000-100000 células/pocillo (dependiendo del tipo celular y del tiempo de incubación con el tratamiento), permitiendo un tiempo de adaptación al medio de 24 h. Una vez transcurrido este tiempo, las células se trataron con los compuestos a estudiar. Finalizado el tratamiento, el medio se retiró y las células se incubaron durante 3-5 horas con 125 µl MTT (1mg/ml en medio cultivo). Tras ese tiempo, se añadieron 80 µl de 20 % SDS en 0,02 M HCl para solubilizar los cristales de formazan-MTT y las placas se incubaron toda la noche en un incubador a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>. Finalmente, se realizó la lectura de las placas en un espectrofotómetro lector de placas a 540 nm (Figura 13). La absorbancia se relacionó de forma directamente proporcional con la viabilidad celular, la cual se expresó en porcentaje con respecto al control. Todos los resultados se obtuvieron de al menos tres experimentos independientes y se expresaron como la media ± el error estándar de la media (SEM). Todos los experimentos se realizaron junto con una serie de controles: fármacos anticancerosos utilizados en clínica (cisplatino, 5-fluorouracilo e hidroxurea) y compuestos con actividad citotóxica

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

inespecífica (ácido cítrico e hipoclorito sódico). Ejemplos representativos de estos controles se encuentran recogidos en el Anexo I.

Cuando se evaluó el papel de la generación de EROs en la citotoxicidad de los compuestos ensayados, se añadieron diferentes antioxidantes una hora antes del tratamiento con los compuestos problemas. Los antioxidantes utilizados fueron n-acetilcisteína (Sigma), enzima catalasa (Fluka) y el mimético de la superóxido dismutasa MnTMPyP (manganeso (III) tetrakis (1-metil-4-piridil) porfirina, Biomol International). La n-acetilcisteína es capaz de disminuir los niveles de EROs celulares de forma directa o indirecta a través del sistema del glutatión. La catalasa es una enzima encargada de la reducción de peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) a agua y oxígeno. El compuesto MnTMPyP es un mimético de la superóxido dismutasa que actúa reduciendo los niveles de anión superóxido.

Los experimentos realizados con las líneas deficientes en alguna de las vías de reparación del daño en el ADN llevaron siempre un compuesto control cuya citotoxicidad es potenciada por la deficiencia en la ruta estudiada. En el Anexo I están recogidos valores representativos de las IC50 obtenidas de estos controles.

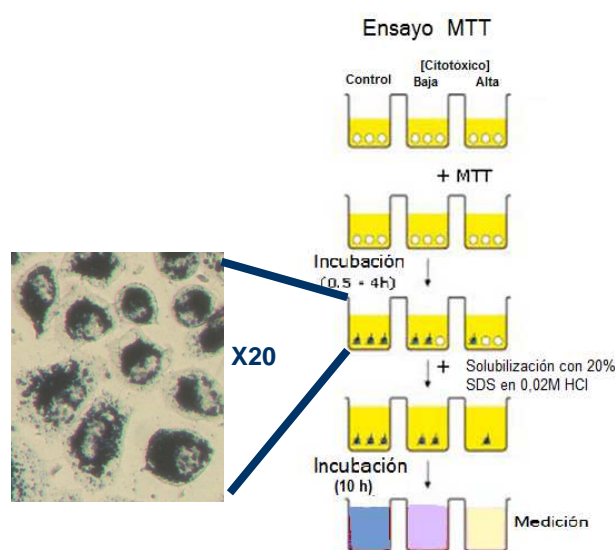


Figura 13. Protocolo seguido para la realización del ensayo MTT. En la fotografía se puede observar el aspecto que presentaban las células tras la incubación con MTT.

## **5. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **5.6. EVALUACIÓN DE LA VIABILIDAD CELULAR MEDIANTE EL ENSAYO XTT.**

La técnica colorimétrica XTT es muy similar al ensayo MTT, pero en este caso, se basa en el uso de una sal de tetrazol (2,3-bis-(2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-2H-tetrazolio-5-carboxanilida, Roche) que es reducido por las enzimas celulares presentes en células viables en un compuesto coloreado y soluble<sup>52,53</sup>. Esta técnica fue utilizada para la evaluación de la actividad citotóxica en células de leucemia K562. El motivo de la utilización de esta técnica en estas células fue debido a que estas células crecen en suspensión, siendo más sencillo la utilización de esta técnica que el MTT.

Células K562 en fase exponencial de crecimiento se sembraron en placas de 96 pocillos (2000 células/pocillo en 100  $\mu$ l), permitiendo un tiempo de adaptación de 24 horas. Tras ese tiempo, se añadieron las correspondientes concentraciones de los compuestos a ensayar. Transcurrido el tiempo de exposición a los compuestos, las células se incubaron con XTT durante 4 horas, tras las cuales, se realizó la lectura de las placas en un lector de placas a 450 nm. La absorbancia se relacionó de forma directamente proporcional con la viabilidad celular, la cual se expresó en porcentaje con respecto al control. Los resultados se expresaron como medias de al menos tres experimentos independientes  $\pm$  el error estándar de la media (SEM).

### **5.7. DETERMINACIÓN DE LA VIABILIDAD CELULAR MEDIANTE EL ENSAYO DE SULFORRODAMINA B.**

Este ensayo colorimétrico estima la viabilidad celular indirectamente por la tinción de las proteínas totales celulares con sulforrodamina B (SRB). SRB es un compuesto que es capaz de unirse a residuos de aminoácidos básicos de las proteínas de la membrana celular<sup>54</sup>.

Células en fase de crecimiento exponencial se sembraron en placas de 96 pocillos en una densidad entre 50000-100000 células/pocillo (dependiendo del tipo celular), permitiendo un tiempo de adaptación al medio de 24 h. Una vez transcurrido este tiempo, las células se trataron con los compuestos a estudiar durante 48 h de exposición. Finalizado el tratamiento, las células se fijaron con 50  $\mu$ l/pocillo de ácido tricloroacético (TCA, Sigma) al 50% y se incubaron por 1 hora a 4°C. Seguidamente, las placas se lavaron con agua destilada para la eliminación del TCA y de las células muertas, puesto que el TCA solamente fija células vivas. Tras este paso, el secado de las placas se realizó a temperatura ambiente. Posteriormente, se añadieron 50  $\mu$ l/pocillo de SRB (Sigma) al 0,4% en ácido acético al 1% e incubadas durante 30 minutos. Finalizado ese tiempo, las placas se lavaron con ácido acético al 1% y se secaron a temperatura ambiente. Finalmente, se añadieron 150  $\mu$ l/pocillo de Trizma Base (10  $\mu$ M, pH 10,5, Sigma) y se realizó la medida de la absorbancia a 495 nm en un espectrofotómetro lector de placas de 96 pocillos. La absorbancia se relacionó de forma directamente proporcional con la viabilidad

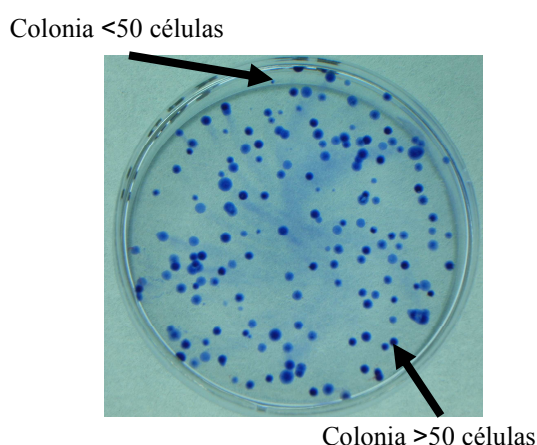
## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

celular, la cual se expresó en porcentaje con respecto al control. Los resultados se expresaron como las medias de al menos tres experimentos independientes  $\pm$  el error estándar de la media (SEM).

### 5.8. ANÁLISIS DE LA SUPERVIVENCIA CELULAR CON EL ENSAYO CLONOGÉNICO.

Mediante este ensayo se evalúa la capacidad que tiene una célula de sobrevivir a la exposición de un compuesto y seguir dividiéndose para formar una colonia de células hijas. Por tanto, es otro ensayo que permite medir el efecto citotóxico de un compuesto.

Células en fase de crecimiento exponencial se sembraron a muy baja densidad (para que las células se encontrasen separadas individualmente) en placas Petri de 6 cm. Después de 4h, las células se incubaron con los compuestos estudiados. Tras un tiempo de exposición adecuado a cada ensayo, el tratamiento se retiró y las placas se incubaron durante 7-9 días para permitir la formación de colonias. Finalizado ese tiempo, las colonias de células se tiñeron con azul de metileno al 0,4% en metanol. Las colonias se contaron considerándose colonia superviviente a aquella colonia formada por un número mayor de 50 células (Figura 14). El número de colonias en cada placa se dividió entre el número de células sembradas, obteniéndose la eficiencia en placa. Los datos obtenidos se expresaron como el porcentaje de supervivencia con respecto a la eficiencia en placa de las células sin tratamiento. Los resultados fueron expresados como las medias de al menos dos experimentos independientes por duplicado  $\pm$  el error estándar de la media (SEM).



*Figura 14. Ejemplo del aspecto de las colonias tras 7 días de incubación sin tratamiento. Las flechas señalan ejemplos de colonias formadas por más o por menos de 50 células.*



### 5.9. DETECCIÓN DE APOPTOSIS MEDIANTE ANEXINA V-FITC Y CITOMETRÍA DE FLUJO.

La apoptosis es un proceso de muerte celular que se caracteriza por unos cambios morfológicos y bioquímicos. Uno de esos cambios es la relocalización de un fosfolípido de la membrana celular, la fosfatidilserina. Este fosfolípido se encuentra en la cara interna de la membrana plasmática, pero durante una de las primeras fases de la apoptosis, pasa a localizarse en la cara externa de la membrana debido a la pérdida de la estructura normal de la membrana plasmática durante el proceso de la apoptosis. Esta técnica aprovecha este hecho. La Anexina V (conjugada con fluoresceína isotiocianato (FITC)) es capaz de unirse a la fosfatidilserina que se encuentra en la cara externa de la membrana plasmática durante la apoptosis, permitiendo detectar las células apoptóticas. Para que se produzca esta unión, es necesaria la presencia de calcio, de ahí la utilización durante el ensayo de un tampón de unión (BB). Posteriormente, en las fases más tardías de la apoptosis y en la necrosis (otro tipo de muerte celular) se produce la pérdida total de la integridad de la membrana plasmática, siendo este el fundamento de utilización del yoduro de propidio (IP). El IP es un colorante vital capaz de unirse al ADN de doble cadena que sirve para determinar el contenido de ADN de la célula. Sin embargo el IP no es capaz de penetrar la membrana plasmática, por lo que sólo será capaz de entrar en las células apoptóticas tardías y en las células necróticas. De esta forma, mediante citometría de flujo se consigue distinguir entre células normales (Anexina e IP negativas), células en apoptosis temprana (Anexina positiva e IP negativa), células en apoptosis tardía (Anexina e IP positivas) y células necróticas (Anexina negativa e IP positiva).

Durante esta tesis, la capacidad de inducir apoptosis de varios compuestos fue evaluada mediante la utilización de un kit de Anexina V-FITC (Cat. no.: 556547, BD Biosciences).

Las células K562 se sembraron en placas de 6 pocillos (62500 células/ml en 4 ml) y se incubaron durante 24 horas. Pasado ese tiempo, las células se trataron con los compuestos a estudiar. Finalizado el tratamiento, las células se recogieron y centrifugaron a 2000 r.p.m. y 15°C durante 3 minutos en tubos de 10, para la posterior retirada del sobrenadante. Después de esto, las células se resuspendieron en 195 µl de BB frío y 5 µl de Anexina y se incubaron a 4°C durante 10 minutos. Pasado ese tiempo, las células volvieron a ser centrifugadas en las mismas condiciones anteriores, para un posterior retirado del sobrenadante y adición de 1 ml de PBS frío. Tras centrifugar y retirar el sobrenadante de nuevo, las células se resuspendieron con 190 µl de BB frío y 10 µl de IP y se incubaron a 4°C durante 10 minutos en oscuridad. Finalmente, se realizó la detección de la muerte celular en un citómetro de flujo (Cytomics FC 500 MPL, Beckman Coulter) y los resultados se procesaron con el software CXP análisis. Los datos obtenidos se representaron como el porcentaje de células viables, en apoptosis temprana,

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

apoptosis tardía y necrosis. Los resultados se expresaron como las medias de al menos tres experimentos independientes  $\pm$  el error estándar de la media (SEM).

Curcumina se utilizó como control positivo apoptótico<sup>55</sup>. Un ejemplo representativo se encuentra en el Anexo I.

### 5.10. EVALUACIÓN DEL DAÑO EN EL ADN MEDIANTE LA ELECTROFORESIS EN GEL DE CÉLULAS INDIVIDUALES (ENSAYO COMETA).

La electroforesis en gel de células individuales o ensayo cometa es una técnica estándar para la detección y cuantificación de daño genético causado por roturas de las hebras de ADN. Cuando se producen estas roturas, el ADN se fragmenta y según el tamaño de esos fragmentos, van a tener distinta movilidad ante una electroforesis. En esta técnica, se produce la lisis de la membrana nuclear de la célula para dejar libre el ADN, seguido de una electroforesis en la cual el ADN según su estado se desplazará de forma distinta por un gel de agarosa. Si el ADN está dañado, se encontrará dividido en varios fragmentos por lo que se desplazará más fácilmente que si estuviera intacto, siendo la migración del ADN proporcional al daño. A mayor número de roturas, se producirán más fragmentos de ADN, que serán más pequeños y migraran más fácilmente a través del gel.

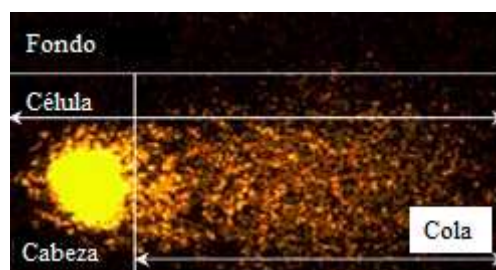
Se realiza en condiciones alcalinas porque de esta forma se pueden detectar daño en el ADN ya sea el daño por rotura de una sola hebra de ADN o sea rotura de las dos hebras de ADN y, además, estas condiciones degradan el ARN por lo que no hay interferencias. La técnica se realizó siguiendo el protocolo del ensayo cometa<sup>56</sup>, con algunas modificaciones. Las células se sembraron en placas de 6 pocillos (aproximadamente 150000 células/pocillo en 2 ml) y se incubaron durante 24 horas antes del tratamiento con los compuestos a estudiar. Finalizado el tratamiento, las células se recogieron y centrifugaron a 1000 r.p.m y 4 °C durante 6 minutos. El sobrenadante se retiró y las células se resuspendieron en un volumen suficiente de PBS frío para obtener una suspensión de células en alta densidad. De la suspensión resultante se tomaron 5  $\mu$ l para ser mezclados con 80  $\mu$ l de 0,7% agarosa de bajo punto de fusión en PBS, depositados sobre un portaobjetos previamente recubierto con 1% de agarosa normal y dejados solidificar a 4°C durante 10 minutos. Después de este tiempo, se añadieron 85  $\mu$ l de 0,7% agarosa de bajo punto de fusión en PBS, volviéndose a dejar solidificar a 4°C durante 10 minutos. Transcurrido ese tiempo, los portaobjetos se colocaron en una solución de lisis ((2,5 M NaCl, 0,1 M Na<sub>2</sub>EDTA, 0,01 M trizma base, 0,77 % N-laurosilsarcosinato, 0,25 M NaOH en agua destilada, pH 10), a los que en el momento de su utilización le fue añadido 1% Triton-X y 10% DMSO) a 4°C durante 30 minutos en ausencia de luz. Una vez lisadas las membranas celulares, los portaobjetos se colocaron en una cubeta de electroforesis con solución de electroforesis (1 mM

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

Na<sub>2</sub>EDTA, 0,3 M NaOH en agua destilada) a 4°C durante 20 minutos para la desnaturalización del ADN. Posteriormente, se realizó la electroforesis durante 20 minutos a 25 V y 300 mA. Finalizada la electroforesis, los portaobjetos se lavaron durante 5 minutos con una solución de neutralización fría (0,4 M trizma base en agua destilada, pH 7,5), con el fin de eliminar los álcalis y los detergentes que pudieran interferir en el siguiente paso. Tras la neutralización, los núcleos se tiñeron con 35 µl DAPI (2 µg/ml en Vectashield®). Finalmente, los portaobjetos se cubrieron con los cubreobjetos y se conservaron en una cámara húmeda hasta su posterior análisis. Se utilizó un microscopio de fluorescencia con captador de imágenes para captar imágenes de los cometas para su posterior análisis con el software CometScore®.

El daño en el ADN se puede cuantificar basándose en dos de los parámetros que se utilizan en el ensayo cometa: el porcentaje de ADN en la cola y el momento cola. El % de ADN en la cola, como su propio nombre indica, es la cantidad de ADN que se encuentra en la cola con respecto al total del ADN (la suma del ADN de la cabeza o núcleo y de la cola del cometa). El momento cola se calcula multiplicando la longitud de la cola (distancia recorrida por el ADN desde la cabeza) por el % de ADN en la cola. A mayor momento cola o mayor % de ADN en la cola, mayor será el daño sobre el ADN (Figura 15).

Todos los ensayos se realizaron junto con un compuesto con capacidad de generar daño el ADN (control positivo). Un ejemplo representativo se encuentra en el Anexo I.



*Figura 15. Ejemplo de cometa (núcleo celular dañado) y de las partes que lo constituyen.*

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.11. DETECCIÓN DE ROTURAS DE ADN DE DOBLE CADENA MEDIANTE EL ENSAYO INMUNOCITOQUÍMICO DE FORMACIÓN DE FOCOS DE $\gamma$ -H2AX.

El ADN está muy enrollado en el núcleo celular y se halla unido a diversas proteínas entre las que se encuentran las histonas. Además de tener una función de soporte del ADN, las histonas pueden ejercer otras funciones tales como la participación en la reparación del ADN. Aunque existen numerosos tipos de histonas, con esta técnica se estudia la H2AX, que está implicada en la reparación del ADN dañado. Cuando se produce una rotura de doble cadena del ADN, la H2AX se fosforila rápidamente en la serina-139 (recibiendo el nombre de  $\gamma$ -H2AX), y actúa de señal para atraer proteínas reparadoras del ADN hacia el punto de rotura. Esta técnica consiste en utilizar un anticuerpo primario que se une a la H2AX fosforilada, y con un anticuerpo secundario (unido a un compuesto fluorescente) contra el anticuerpo primario, se detectan los puntos de rotura del ADN en los cuales se encuentra la  $\gamma$ -H2AX. Por tanto, estos puntos de roturas señalizados por esta histona pueden visualizarse como unos focos de fluorescencia.

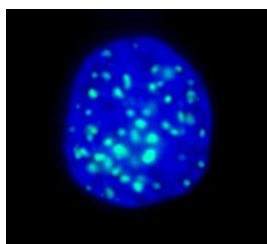
Células en fase de crecimiento exponencial se sembraron sobre cubreobjetos estériles en placas de 6 pocillos (aproximadamente 150000 células/pocillo en 2ml) y se incubaron durante 24 horas. El tratamiento se realizó tras esas 24 horas. Finalizado el tratamiento, el medio se retiró y las células se lavaron con PBS (a Tª ambiente) y se fijaron con 800  $\mu$ l de 4% paraformaldehído durante 10 minutos. Posteriormente, las células se lavaron de nuevo con PBS y después se permeabilizaron con una solución permeabilizante (0,25 % Triton X-100 en PBS) durante 5 minutos. Una vez permeabilizadas las células para permitir la entrada de los anticuerpos, se lavaron 3 veces con una solución de bloqueo (1% BSA, 0,1% Tween 20 en PBS). Posteriormente, las células se lavaron con 85  $\mu$ l del anticuerpo policlonal de ratón contra  $\gamma$ -H2AX (Invitrogen), preparado a 1:800 en solución de bloqueo, durante 1 hora a temperatura ambiente. Tras ese tiempo, las células se lavaron 3 veces con PBS, seguido de 3 lavados con la solución de bloqueo. Tras este paso, las células fueron incubadas con 85  $\mu$ l del anticuerpo secundario de cabra anti-IgG murino conjugado con Alexa Fluor-488 (Invitrogen), preparado a 1:500 en solución de bloqueo, durante 1 hora en oscuridad. A la hora, se volvieron a lavar 3 veces con PBS, seguido de otros 3 lavados con la solución de bloqueo y de nuevo 3 veces con PBS. Una vez finalizados estos lavados, las células se incubaron con DAPI (Sigma), preparado a 1: 50000 en PBS, durante 10 minutos, tras los cuales las células se lavaron 3 veces con PBS. Finalmente, los cubreobjetos se depositaron en portaobjetos con una gota de Vectashield® y se fijaron con laca de uñas. El análisis se realizó con un microscopio de fluorescencia con captador de imágenes. Se contaron los focos de  $\gamma$ -H2AX presentes en cada célula, considerándose células positivas (con daño en el ADN) aquellas con más de 10 focos (Figura 16). La frecuencia de las

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

células positivas se determinó con tres experimentos separados. Al menos 200 núcleos se contaron por cada muestra.

Para las células K562, debido a que crecían en suspensión, el paso de fijación tuvo que realizarse de manera especial. Tras el tratamiento, las células se centrifugaron a 1000 r.p.m y 4 °C durante 6 minutos, retirando el sobrenadante y resuspendiendo las células en 100 µl de PBS frío, volviendo a centrifugar en las mismas condiciones. El sobrenadante se retiró nuevamente, y las células se resuspendieron en 100 µl de metanol puro, dejando 20 minutos a -20 °C. Las células se centrifugaron nuevamente a 1000 r.p.m. y 4 °C durante 6 minutos, y tras retirar el sobrenadante, se resuspendieron en 100 µl de metanol puro. De esa suspensión, se depositaron unos 20 µl sobre el cubreobjeto correspondiente y se permitió la evaporación del metanol a temperatura ambiente. Finalizado el paso de la fijación, se continuó con el paso de la permeabilización como se ha comentado en el párrafo anterior.

Durante estos experimentos fue utilizado como control positivo una dosis de 4 Gy de rayos X. En el Anexo I puede encontrarse un ejemplo representativo de los resultados obtenidos con este control positivo.



*Figura 16. Ejemplo del aspecto que presenta una célula con daño en el ADN evaluado mediante la técnica inmunocitoquímica de focos de  $\gamma$ -H2AX. Se observa un núcleo teñido con DAPI (azul) y la formación de numerosos focos de  $\gamma$ -H2AX (verde). Una célula con más de 10 focos de  $\gamma$ -H2AX se considera con daño en el ADN.*

### 5.12. ANÁLISIS DE LA FORMACIÓN DE COMPLEJOS DE ROTURA ADN-TOPOISOMERASAS MEDIANTE LA TÉCNICA TARDIS.

Las topoisomerasas son las enzimas encargadas de modificar la topología del ADN durante los procesos celulares de la replicación, la reparación, la transcripción y la recombinación, mediante su rotura y posterior unión. El complejo que se forma entre las topoisomerasas y el ADN es lo que se detecta y cuantifica con este ensayo, que se basa en la utilización de anticuerpos específicos para los complejos de ADN con topoisomerasa I y la topoisomerasa II. Se siguió la técnica como está descrita por Willmore y cols.<sup>57</sup>.

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

Las células K562 se sembraron en placas de 6 pocillos (30000 células/pocillo) y se incubaron durante 48 horas. Transcurrido ese tiempo, las células se trataron con los compuestos a estudiar. Una vez finalizado el tratamiento, 50 µl de la suspensión de células se mezclaron con un volumen igual de una solución de agarosa fundida (2% peso/volumen en PBS) para su extensión sobre un portaobjetos (previamente recubierto con 1% de agarosa normal) y dejando solidificar la agarosa a 4°C. Posteriormente, los portaobjetos se colocaron en una solución de lisis (1% SDS, 80 mM buffer fosfato pH 6,8, 10 mM EDTA, y una mezcla de inhibidores de proteasas (2 µg/ml pepstaina, 2 µg/ml leupeptina, 1 mM fenilmetilsulfonil fluorida, 1 mM benzamidina y 1 mM ditiotreitól)) durante 30 minutos a temperatura ambiente para desintegrar la membrana celular, seguido de la inmersión durante 30 minutos en una solución de 1 mM NaCl con inhibidores de proteasas a temperatura ambiente. Luego se lavaron 3 veces con PBS (5 minutos/lavado) antes de la incubación con el anticuerpo primario durante 2 horas en atmósfera húmeda. El anticuerpo primario de ratón anti-topoisomerasa I (Sigma) se preparó 1:1000 en 0,1% Tween 20 y 1% BSA en PBS. El anticuerpo primario de conejo anti-topoisomerasa II (cedido por la Dra. Austin) se preparó 1:200 en 0,1% Tween 20 y 1% BSA en PBS. Una vez finalizado el tiempo de incubación con los anticuerpos primarios, los portaobjetos se lavaron 3 veces con 0,1 % Tween 20 en PBS y se incubaron con el anticuerpo secundario durante 2 horas en atmósfera húmeda. Para el anticuerpo primario anti-topoisomerasa I fue utilizado el anticuerpo secundario de cabra anti-IgG murino conjugado con FITC (Sigma), preparado a 1:50 en 0,1% Tween 20 y 1% BSA en PBS. Para el anticuerpo primario anti-topoisomerasa II fue utilizado el anticuerpo secundario de ratón anti-IgG de conejo conjugado con FITC (Sigma), preparado a 1: 200 0,1% Tween 20 y 1% BSA en PBS. Tras la incubación con el anticuerpo secundario, los portaobjetos se lavaron 3 veces con 0,1 % Tween 20 en PBS, seguido de un lavado final (toda la noche a 4 °C) con inhibidores proteasas en PBS. Finalmente, se tiñeron con el colorante Hoechst (Sigma), que tiñe el ADN y se utiliza para la localización de las células. Finalmente, se colocaron los cubreobjetos. El análisis se realizó con un microscopio de fluorescencia. Las imágenes se analizaron con el software Imagen 2 (Astrocam Ltd., Cambridge, UK). Si un fármaco induce complejos de rotura ADN-topoisomerasa, el anticuerpo primario se unirá a estos complejos, y gracias al anticuerpo secundario, se producirá fluorescencia que será el indicador de la actividad del fármaco (Figura 17).

Como controles positivos se utilizaron el inhibidor de topoisomerasa I, camptotecina, y el inhibidor de topoisomerasa II, etopósido, con ejemplos representativos de los resultados obtenidos en el Anexo I.



*Figura 17. Ejemplo de imagen de células no tratadas y células tratadas con un veneno de topoisomerasa. Los núcleos pueden observarse de color azul debido al Hoechst (fotografías de la izquierda). La fluorescencia color verde indica la presencia de complejos de rotura ADN-topoisomerasa (fotografía inferior derecha). Cuando no hay un veneno de topoisomerasa, no se estabilizan los complejos, por lo que el anticuerpo no se puede unir y no se observa fluorescencia (fotografía superior derecha).*

### 5.13. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD GLICOLÍTICA CELULAR.

La glicólisis es la ruta catabólica de la glucosa. En esta ruta una molécula de glucosa es transformada en dos moléculas de piruvato, con el objetivo de generar energía en forma de ATP. En el proceso es consumido  $\text{NAD}^+$  que es regenerado mediante la conversión del piruvato en lactato por la lactato deshidrogenasa. De esta forma se dispone de  $\text{NAD}^+$  para poder continuar realizando la glicólisis.

La alteración de la glicólisis por un compuesto puede ser medida mediante el análisis de la concentración de glucosa (producto inicial de la glicólisis) y lactato (producto final de la glicólisis) de las células tratadas frente a las células sin tratar.

Células en crecimiento exponencial se sembraron a una densidad de  $10^6$  células/pocillo en placas de 6 pocillos. Tras un tiempo de 8 horas desde la siembra, el medio se renovó y las células se trataron con los compuestos a estudiar durante 8 h. Finalizado el tratamiento, el medio de las células se recogió en tubos para su análisis. La medición de los niveles de lactato y glucosa se realizó mediante la utilización de tiras reactivas de BM-Lactato y glucosa Accutrend con el analizador Accutrend® Plus (Roche Diagnostics). Después de calibrar el aparato con las tiras de calibración adecuadas, la medición de los niveles de lactato y glucosa se realizó acorde a las instrucciones de fábrica<sup>58</sup>. Los resultados se expresaron como porcentaje de lactato producido y porcentaje de glucosa consumida en relación a las células sin tratamiento, y se



## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

representaron como las medias  $\pm$  el error estándar de la media (SEM) de tres experimentos independientes.

Estos experimentos se llevaron a cabo siempre con controles positivos (inhibidores glicólisis) y con controles negativos (no inhibidores glicólisis). El Anexo I recoge un ejemplo representativo de los resultados obtenidos con los controles.

### 5.14. ANÁLISIS DE LA COMBINACIÓN DE FÁRMACOS.

El objetivo de la combinación de varios fármacos es conseguir un efecto sinérgico por el cual se potencia la actividad que muestran los compuestos por separado, consiguiendo el incremento de la eficacia del efecto terapéutico de los compuestos, la disminución de los posibles efectos adversos, la minimización del desarrollo de resistencias farmacológicas o el incremento de la selectividad del efecto hacia una diana específica. Por estos beneficios terapéuticos, la combinación de fármacos ha sido muy utilizada en el tratamiento de numerosas enfermedades, como el SIDA y el cáncer. Sin embargo, la combinación de fármacos también puede producir todo lo contrario: disminución de la eficacia del efecto terapéutico de los compuestos, potenciar los efectos adversos o producir resistencias farmacológicas. Estos efectos negativos son conocidos como antagonismo. También puede ocurrir lo que se conoce como efecto aditivo, que es simplemente una suma de los efectos producidos por los fármacos por separado.

Durante esta tesis se evaluaron diferentes combinaciones de compuestos para intentar potenciar el efecto anticanceroso que presentaron estos compuestos por separado. Para poder valorar el efecto de la combinación de estos compuestos sobre su actividad citotóxica se utilizó el parámetro conocido como Índice de combinación (CI). Este parámetro permite conocer si la combinación de dos o más fármacos tiene un efecto sinérgico, aditivo o antagónico de forma cuantitativa. El cálculo de CI se realizó con el software Compusyn®, que se basa en el método de Chou-Talalay<sup>59</sup>. *Un valor de CI <1 es considerado sinergismo y se representa con “+++++” para sinergismo muy fuerte (CI<0.1), “++++” para sinergismo fuerte (CI=0.1-0.3), “+++” para sinergismo (CI=0.3-0.7), “++” para sinergismo moderado (CI=0.7-0.85) y “+” para sinergismo ligero (CI=0.85-0.9). Un valor de CI entre 0.9 y 1.1 se considera efecto aditivo y es indicado con “±”. Un valor de CI >1 es considerado antagonismo y es representado por “-” para antagonismo ligero (CI=1.1-1.2), “--” para antagonismo moderado (CI=1.2-1.45), “---” para antagonismo (CI=1.45-3.3), “----” para antagonismo fuerte (CI=3.3-10) y “-----” para antagonismo muy fuerte (CI>10).*

### 5.15. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

Los resultados obtenidos mediante las distintas técnicas comentadas en los apartados anteriores se expresaron como la media de al menos tres experimentos independientes  $\pm$  el error estándar de la media (SEM). Para la determinación de la significación estadística de la diferencia entre las medias, se utilizó la prueba de la t de Student (pareada y de dos colas de distribución), la cual se calculó mediante el software Microsoft Office 2003. El resultado de esta prueba es la obtención del valor P que permite saber si la diferencia entre dos valores es estadísticamente significativa o no. Un valor de  $P > 0,05$  no es considerado estadísticamente significativo y no se representa por ningún símbolo. Un valor de  $P < 0,05$  es considerado estadísticamente significativo y se representa con un asterisco (\*) para un valor entre 0,01-0,05, con dos asteriscos (\*\*) para un valor entre 0,001-0,01 y con tres asteriscos (\*\*\*) para un valor  $< 0,001$ .

En los ensayos de viabilidad celular y supervivencia los valores comparados fueron las diferencias de viabilidad entre las dos líneas celulares tras recibir un tratamiento, a excepción de los experimentos con antioxidantes en donde los valores comparados fueron la viabilidad celular de células tratadas con el compuesto a estudiar en presencia y ausencia de los antioxidantes. En los ensayos de AnexinaV-FITC, daño en el ADN e inhibición de la glicólisis los valores comparados fueron el efecto del tratamiento con respecto al control sin tratamiento.

## **6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

## **6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

## **6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Como se ha comentado en los apartados anteriores, el objetivo principal de esta tesis es la búsqueda de nuevos fármacos selectivos para el tratamiento del cáncer de pulmón. Para cumplir con este objetivo, esta búsqueda se ha basado en las estrategias terapéuticas selectivas discutidas en el apartado de Antecedentes. Estas estrategias son la utilización de los defectos de las células cancerosas en proteínas involucradas en las vías de reparación del daño en el ADN, la utilización de las alteraciones metabólicas de las células cancerosas y la realización de un cribado de compuestos. Estas estrategias están relacionadas entre sí, por lo que no es posible clasificar los resultados obtenidos según la estrategia utilizada. Por este motivo, los resultados se presentan por compuestos evaluados.

### 6.1 EPOXIALQUIL GALACTOPIRANÓSIDOS.

El ADN contiene numerosos puntos nucleofílicos que lo hacen susceptible al ataque químico de moléculas con grupos electrófilos. En esta reacción se basa el mecanismo de acción de muchos de los fármacos anticancerosos que dañan el ADN, como es el caso del treosulfan. El treosulfan es un fármaco alquilante utilizado en casos de cáncer de ovario avanzado. Se trata de un profármaco que en el organismo va dar lugar a un derivado epóxido que será el que tenga actividad anticancerosa al inducir daño en el ADN<sup>60</sup>. Esta generación de daño en el ADN se debe al carácter electrófilo del grupo epóxido que se forma durante la activación del treosulfan, que será capaz de reaccionar con grupos nucleófilos del ADN como el presente en la base nitrogenada guanina. Esta capacidad de generar daño en el ADN también se ha observado en otros epóxidos<sup>61-64</sup>.

Esta capacidad de los epóxidos para inducir lesiones en el ADN hizo pensar que compuestos que presentasen un grupo epóxido en su estructura podrían llegar a tener actividad anticancerosa. Por este motivo, durante esta tesis fue evaluada la posible actividad anticancerosa de una nueva serie de compuestos sintéticos con un grupo epóxido en su estructura. Estos compuestos eran una serie de derivados epoxialquil galactopiranosidos que fueron sintetizados por el grupo de investigación de los Drs. José Manuel Vega-Pérez y Fernando Iglesias-Guerra de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Sevilla<sup>49</sup>. Los compuestos evaluados fueron los siguientes: (2R)-2,3-Epoxipropil 4,6-O-(S)-bencilideno-β-D-galactopiranosido (32), (2S,3S)-2,3-Epoxidecil 4,6-O-(S)-bencilideno-β-D-galactopiranosido (35) y (2R)-2,3-Epoxi-2-metilpropil 4,6-O-(S)-bencilideno-β-D-galactopiranosido (37)<sup>49</sup>. La estructura química de estos compuestos se encuentra recogida en la Figura 18.

En primer lugar se evaluó la posible actividad anticancerosa selectiva frente a células de cáncer de pulmón y, posteriormente, se estudió los posibles mecanismos de acción implicados en la actividad citotóxica de estos compuestos.

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

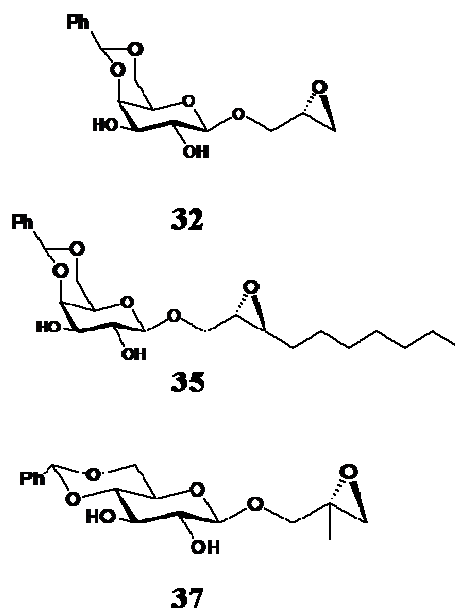


Figura 18. Estructura química de los compuestos epoxialquil galactopiranosidos evaluados.

### 6.1.1. Actividad anticancerosa selectiva de epoxialquil galactopiranosidos en células de cáncer de pulmón.

En primer lugar, se evaluó la posible actividad anticancerosa selectividad de estos nuevos epoxialquil galactopiranosidos sobre células cancerosas mediante el ensayo de viabilidad celular MTT. Se estudió un rango de concentraciones que abarcó desde 10  $\mu$ M hasta 1 mM de estos compuestos en células de cáncer de pulmón A549 y en células normales de pulmón MRC-5. El tratamiento se llevó a cabo durante 48 horas, tras las cuales se realizó la técnica MTT y se obtuvieron los resultados que se recogen en la Figura 19 y Tabla 3.

Compuesto	IC <sub>50</sub> (media $\pm$ SEM; $\mu$ M)		p
	MRC-5	A549	
<b>32</b>	556,3 $\pm$ 24,7	405,1 $\pm$ 38,8	*
<b>35</b>	209,1 $\pm$ 54,2	75,4 $\pm$ 25,3	*
<b>37</b>	334 $\pm$ 22,3	160,9 $\pm$ 1,3	**

Tabla 3. Valores de IC<sub>50</sub> de los derivados epoxialquil galactopiranosidos 32, 35 y 37 en células MRC-5 y A549 tras 48 horas de tratamiento por el ensayo MTT.

Los tres compuestos demostraron actividad citotóxica, pero solamente los compuestos 35 y 37 mostraron una mayor actividad citotóxica sobre células cancerosas que sobre células normales. El compuesto 32 tuvo una actividad citotóxica similar sobre ambas líneas celulares,

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

aunque su valor de IC<sub>50</sub> para células cancerosas fue ligeramente inferior que para células normales, siendo 1,3 veces inferior. El compuesto 37 demostró una modesta actividad citotóxica selectiva sobre células cancerosas, pero fue el compuesto 35 el que presentó mayor actividad citotóxica selectiva desde la concentración más baja ensayada (10  $\mu$ M) hasta concentraciones 10 veces superiores (100  $\mu$ M), con un valor de IC<sub>50</sub> 2,8 veces menor para las células cancerosas que para las células normales. Por este motivo, se escogió el compuesto 35 para la evaluación de los posibles mecanismos de acción implicados en su actividad anticancerosa selectiva.

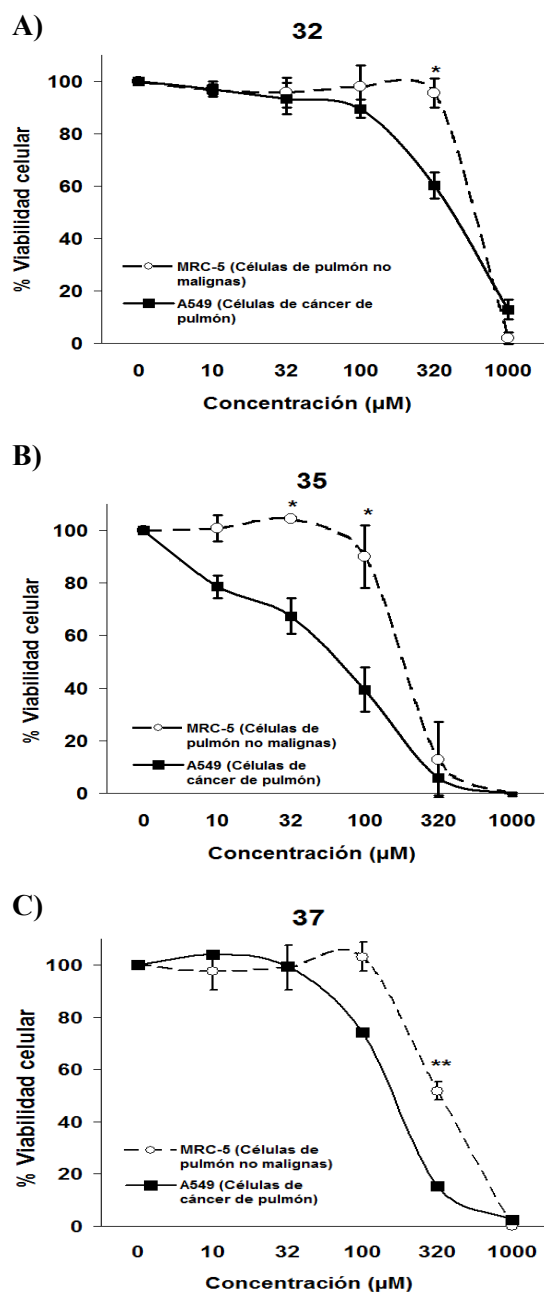


Figura 19. Actividad citotóxica de derivados epoxialquil galactopiranosidos 32, 35 y 37 en células normales MRC-5 y células cancerosas A549 de pulmón. El tiempo de tratamiento fue de 48 h (ensayo MTT).



## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 6.1.2. *Epoxialquil galactopiranosidos inducen daño en el ADN.*

Como se ha discutido anteriormente, el motivo de escoger estos compuestos epóxidos para la evaluación de su actividad anticancerosa fue debido a la posibilidad de generación del daño en el ADN. Para evaluar si el efecto citotóxico demostrado por estos compuestos epóxidos realmente se debía a la generación de daño en el ADN, se realizó el ensayo cometa. Este ensayo utiliza el porcentaje de ADN en la cola y el momento cola como parámetros para medir el daño en el ADN. Además, el momento cola también permite un análisis más exhaustivo del daño en el ADN al dar información del verdadero porcentaje de células que presentaron daño en el ADN y la intensidad del mismo.

Para la realización del ensayo cometa, células A549 fueron tratadas con 300  $\mu$ M del compuesto 35 durante 4 horas (Figura 20). El compuesto 35 demostró inducir daño en el ADN de forma significativa y comparable al daño generado por el control positivo camptotecina (cpt), un veneno de topoisomerasa. Aunque solamente el 30% de las células tratadas con el compuesto 35 presentaron daño en el ADN, este daño fue elevado como se puede observar en la Figura 20A, en la cual se representa un cometa típico observado con este tratamiento. Estos datos confirman que la generación de daño en el ADN contribuye al efecto citotóxico de este nuevo compuesto epóxido.

Las células poseen mecanismos para defenderse del daño generado en el ADN por agentes exógenos, como los fármacos anticancerosos, disminuyendo el efecto citotóxico de estos compuestos. Sin embargo, también se sabe que ciertos tumores presentan defectos en los mecanismos de reparación, pudiéndolos hacer más sensibles al efecto citotóxico de estos fármacos que generan daño en el ADN. Por este motivo, se decidió evaluar el posible mecanismo implicado en la reparación del daño generado en el ADN por el compuesto 35.

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

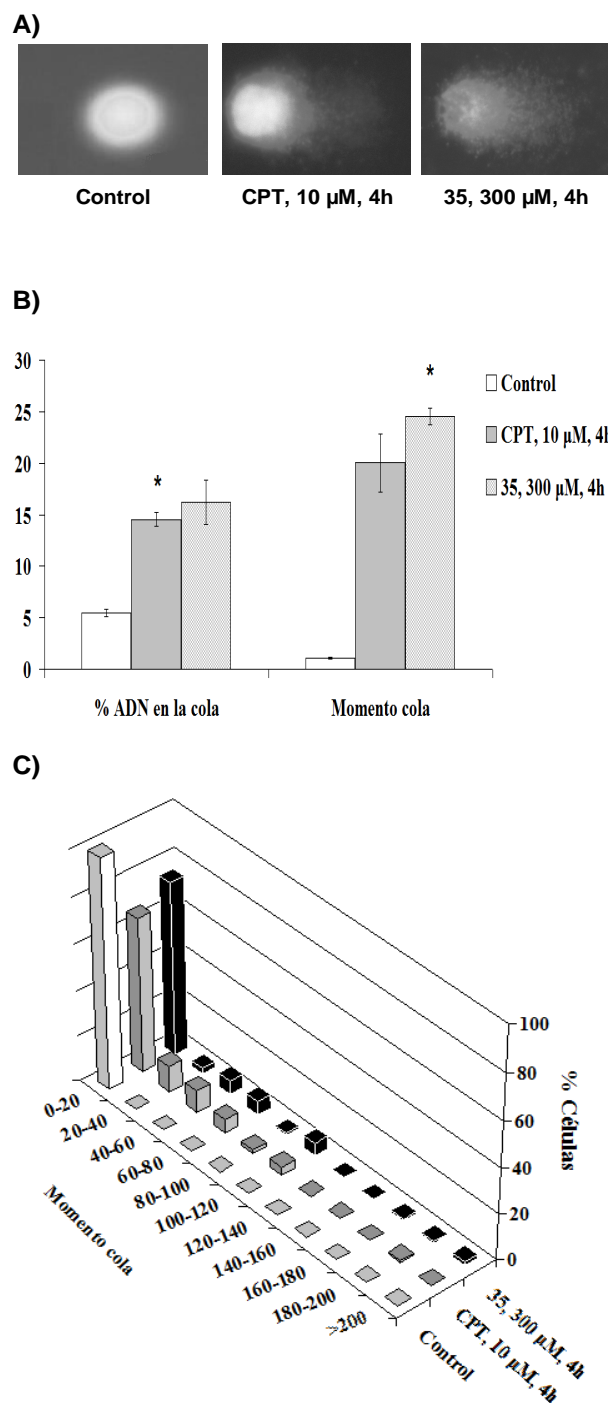


Figura 20. Estudio del daño en el ADN mostrado por el epoxialquil galactopiranosido 35 mediante ensayo cometa. A) Fotografías representativas de células no tratadas, células tratadas con el control positivo camptotecina (CPT), y de células expuestas a 300  $\mu$ M del compuesto 35 durante 4 horas. B) Cuantificación del daño en el ADN expresado como porcentaje de ADN en la cola y como momento cola (longitud de la cola X porcentaje de ADN en la cola). C) Distribución de las células en diferentes intervalos de valores de momento cola. Estos datos corresponden a la media de dos experimentos independientes.

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### *6.1.3. La reparación por escisión de nucleótidos participa en la reparación del daño en el ADN inducido por el epoxialquil galactopiranosido 35.*

Se sabe que los epóxidos son electrófilos que reaccionan con grupos nucleofílicos como los presentes en la base nitrogenada guanina que forma parte del ADN, formando una serie de aductos que generan daño en el ADN<sup>60-64</sup>. En la reparación de estos aductos interviene la vía de reparación por escisión de nucleótidos (NER)<sup>65,66</sup>. Esto hizo pensar que el daño en el ADN inducido por el epoxialquil galactopiranosido 35 podría ser reparado por NER. Con el objetivo de estudiar la implicación de NER en la reparación del daño inducido por este compuesto, su citotoxicidad fue evaluada sobre una serie de líneas celulares deficientes en alguna de las proteínas implicadas en NER frente a una línea parental no deficiente en NER mediante el ensayo de viabilidad celular MTT. Las líneas celulares fueron expuestas durante 24 h al compuesto. Tras este tiempo, las células fueron incubadas durante 48 horas libres del compuesto para permitir actuar a NER y reparar los posibles aductos formados. Como se puede observar en la Figura 21, el compuesto 35 fue ligeramente más citotóxico, aunque de forma no significativa, para las líneas celulares deficientes en NER con unas IC<sub>50</sub> (media  $\pm$  SEM;  $\mu$ M) de  $190,4 \pm 14,8$ ;  $107,2 \pm 50,9$  y  $92,57 \pm 32,8$  para las líneas celulares AA8 (NER funcional), UV4 (XPF -/-; deficientes en NER) y UV5 (XPD -/-; deficientes en NER) respectivamente. Los valores de IC<sub>50</sub> del compuesto 35 para ambos tipos de células deficientes en NER demostraron ser aproximadamente 2,4 veces menores que el valor de IC<sub>50</sub> para las células con NER funcional. Esto indica que NER se encuentra implicada en la reparación del daño en el ADN inducido por este epoxialquil galactopiranosido. Para comprobar si otras vías de reparación del daño en el ADN también se encontraban involucradas en la reparación de las lesiones en el ADN inducidas por este epóxido, se midió su citotoxicidad sobre una serie de líneas deficientes en HR, NHEJ y BER, frente a sus respectivas líneas celulares parentales (no deficientes) en las mismas condiciones que el experimento diseñado para NER. Los resultados obtenidos no mostraron que alguna de estas otras vías estuviese implicada en la reparación del daño en el ADN inducido por el compuesto 35 (datos no mostrados).

La implicación de NER en la reparación del daño en el ADN inducido por el compuesto 35 sugiere que cánceres de pulmón deficientes en NER podrían ser más sensibles al efecto citotóxico de este compuesto.

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

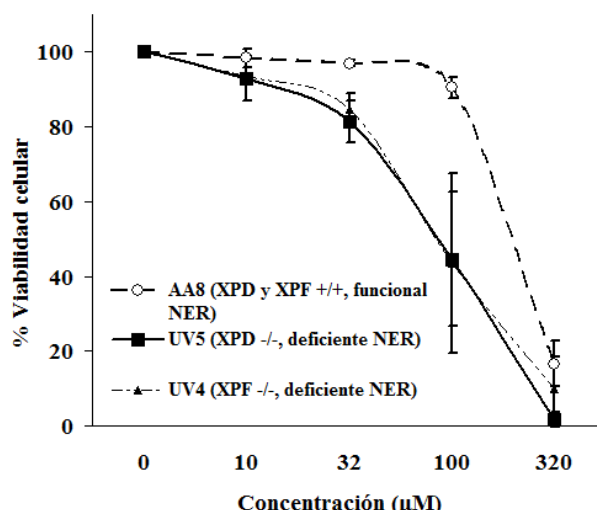


Figura 21. Papel de la vía de reparación por escisión de nucleótidos (NER) en la reparación del daño en el ADN inducido por el epoxialquil galactopiranósido 35. Células UV5 (mutadas en XPD; deficientes en NER), células UV4 (mutadas en XPF; deficientes en NER) y células AA8 (células parentales; funcionales en NER) fueron expuestas a varias concentraciones del compuesto 35 por 24 h y, después de 48 h de recuperación, la viabilidad celular fue estimada con el ensayo MTT.

### 6.1.4. Epoxialquil galactopiranósido 35: formación de EROs e inhibición de la glicólisis.

Aunque la selectividad citotóxica por células cancerosas mostrada por este compuesto podría deberse a la gran inestabilidad genética que presentan estas células, haciéndolas más vulnerables a agentes que dañen el ADN en comparación con las células normales, podría ser posible que este nuevo compuesto epóxido tuviese otros mecanismos citotóxicos que interviniesen en dicha selectividad.

Las células cancerosas se caracterizan por tener proliferación descontrolada mediante el desarrollo de una serie de habilidades<sup>4</sup>. Entre una de estas habilidades se encuentra la reprogramación metabólica para poder soportar la elevada demanda de energía y de precursores necesarios para la división celular. Una consecuencia de esta reprogramación metabólica es el elevado nivel de estrés oxidativo que las células cancerosas presentan<sup>33,36</sup>. En los últimos años se ha empezado a estudiar este estrés oxidativo como una nueva diana terapéutica selectiva contra el cáncer mediante la utilización de agentes prooxidantes que incrementen los niveles de EROs a niveles citotóxicos para las células cancerosas pero no para las células normales. Para evaluar la posibilidad de la generación de EROs como mecanismo implicado en la citotoxicidad selectiva demostrada por el epoxialquil galactopiranósido 35, células A549 fueron pre-incubadas con una serie de antioxidantes (MnTMPyP, un mimético de la superóxido dismutasa

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

que reduce los niveles de anión superóxido; catalasa, que reduce al peróxido de hidrógeno, y n-acetilcisteína, que disminuye los niveles de EROs a través del sistema del glutatión) antes de la exposición al compuesto 35. La viabilidad de las células fue testada mediante el ensayo MTT. Los resultados obtenidos (Figura 22) sugieren que este compuesto epóxido no está generando EROs o que si las genera, éstas no juegan un papel en el mecanismo de citotoxicidad de este compuesto.

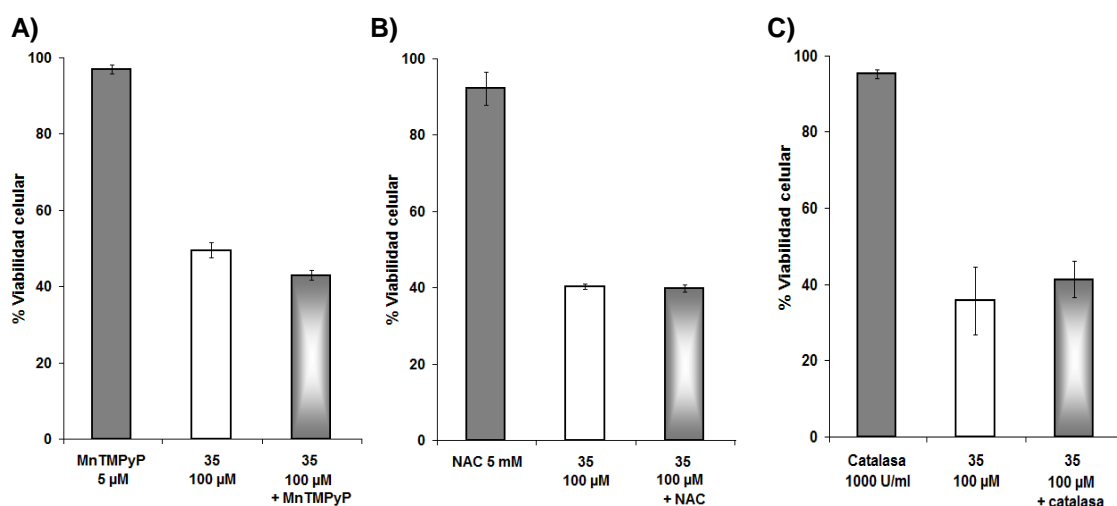


Figura 22. La citotoxicidad del compuesto 35 no es debida a la generación de EROs. A549 fueron expuestas al epoxialquil galactopiranosido 35 durante 48 h en presencia o ausencia del mimético superóxido dismutasa MnTMPyP (A), de la enzima catalasa (B) y del antioxidante n-acetilcisteína (NAC) (C), los cuales fueron añadidos previamente una hora antes al compuesto 35.

Por otra parte, dentro de la reprogramación metabólica de las células cancerosas, destaca su gran dependencia de la glicólisis para poder mantener el estado energético, el aporte de macromoléculas para la biosíntesis y el mantenimiento del equilibrio redox necesarios para poder soportar esa rápida proliferación que las caracteriza. Por esta razón, se ha empezado a ver la glicólisis como una nueva posible diana terapéutica selectiva en el tratamiento del cáncer<sup>25</sup>. En esta búsqueda se ha empezado a evaluar el uso de inhibidores de la glicólisis como la 2-deoxiglucosa que es un análogo de la glucosa que actúa como un falso sustrato para la hexoquinasa, inhibiendo la glicólisis.

El epoxialquil galactopiranosido 35 contiene dos moléculas de galactosa formando parte de su estructura. Se sabe que la galactosa puede ser utilizada por las células para sintetizar glucosa. Por ello, se pensó que este compuesto podría actuar como un falso sustrato al igual que la 2-deoxiglucosa para la glicólisis, inhibiéndola, lo que contribuiría a la selectividad citotóxica por células cancerosas observada en este compuesto. La posible inhibición por el compuesto 35

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

fue ensayada mediante la medición de las concentraciones de glucosa (producto inicial de la glicólisis) y lactato (producto final de la glicólisis) en células A549 tratadas o no con este compuesto durante 8 horas. Los resultados demostraron que este compuesto no indujo la inhibición de la glicólisis, al no observarse diferencia entre los niveles de lactato producidos y glucosa consumidos de las células tratadas con compuesto 35 y las células sin tratar (Figura 23). Esto descarta la inhibición de la glicólisis como uno de los mecanismos de acción de este epoxialquil galactopiranosido.

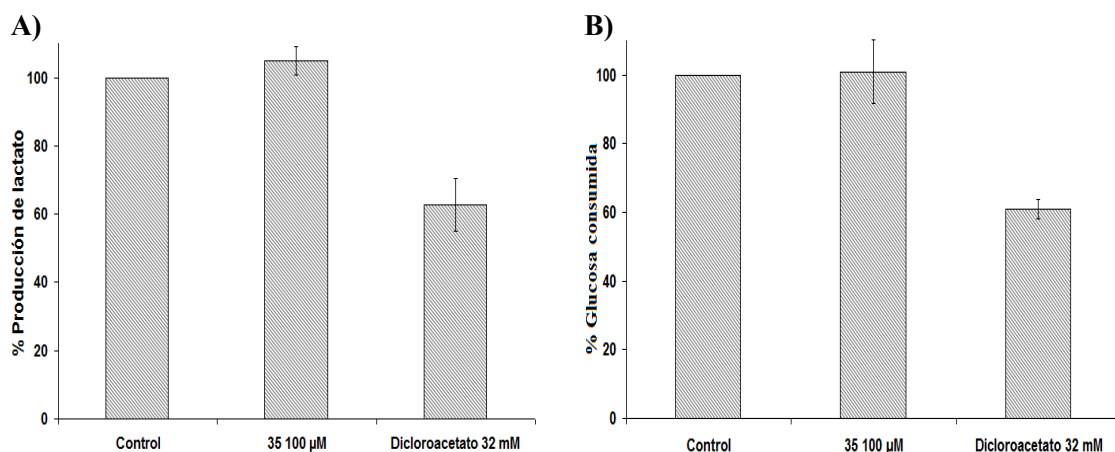


Figura 23. El compuesto 35 no induce inhibición de la glicólisis en células A549. A) Porcentaje de producción de lactato y B) porcentaje de consumo de glucosa en células A549 expuestas 8 h al compuesto 35 y dicloroacetato (control positivo) en relación a las células no tratadas.

6.1.5. El epoxialquil galactopiranosido 35 posee actividad anticancerosa selectiva *in vitro* frente a células cancerosas de mama y de melanoma.

Finalmente, se evaluó si el compuesto 35 presentaba actividad anticancerosa selectiva sobre otros tipos de cáncer. Células de cáncer de mama MCF7, células de melanoma UACC-62, células de mama no malignas MCF10 y células de piel no malignas VH10 fueron expuestas a varias concentraciones del compuesto 35 durante 48 h, tras las cuales se realizó el ensayo MTT para la valoración de la viabilidad celular. Este compuesto también demostró actividad citotóxica selectiva sobre ambos tipos de células cancerosas (Figura 24). Los valores de IC<sub>50</sub> (media  $\pm$  SEM;  $\mu$ M) en células MCF10 y MCF7 fueron  $111,9 \pm 6,1$  y  $40,0 \pm 1,1$  ( $p < 0,01$ ), respectivamente; mientras que para células VH10 y UACC-62 fueron  $227,8 \pm 62,5$  y  $104,6 \pm 25,9$  ( $p > 0,05$ ), respectivamente. Este compuesto mostró una citotoxicidad selectiva sobre células cancerosas de mama similar a la mostrada sobre células cancerosas de pulmón, siendo la IC<sub>50</sub> 2,8 veces menor para las células cancerosas de mama que para las células normales. Sin

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

embargo, la selectividad mostrada sobre células de melanoma fue ligeramente menor, con un valor de IC<sub>50</sub> 2,2 veces menor para las células de melanoma que para las células normales.

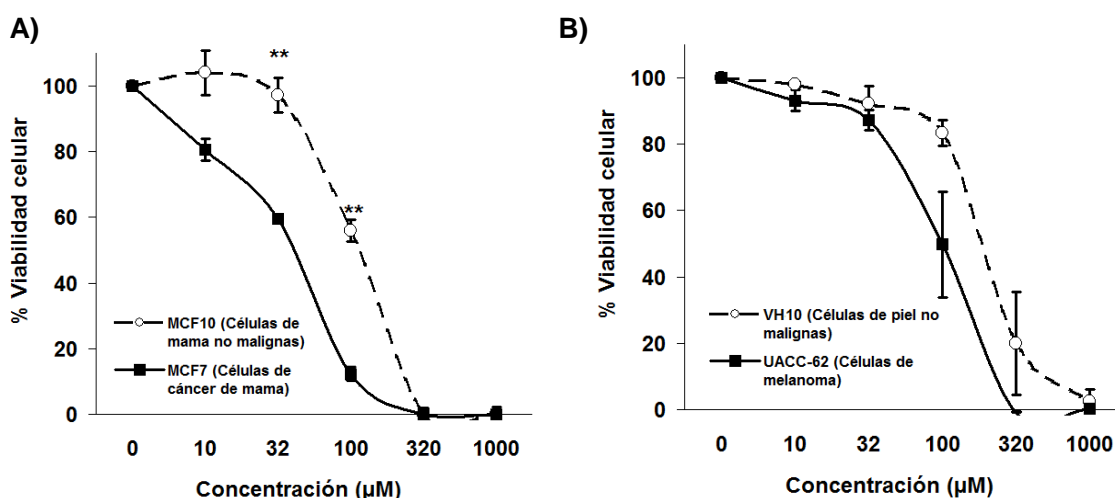


Figura 24. Células de cáncer de mama MCF7 y de melanoma UACC-62 son más sensibles que células normales de mama MCF10 y piel VH10 a la actividad citotóxica del epoxialquil galactopiranosido 35. El tiempo de tratamiento fue de 48 h (ensayo MTT).

La citotoxicidad del compuesto 35 también fue evaluada sobre células de cáncer colorrectal HTC116. Estas células fueron expuestas a este compuesto durante 48 h, tras las cuales se llevó a cabo el ensayo colorimétrico MTT. Como se puede observar en la Figura 25, este compuesto también demostró una actividad citotóxica sobre estas células cancerosas, con una IC<sub>50</sub> (media ± SEM) de 48,2 μM ± 6,9 μM, que fue similar a la citotoxicidad demostrada sobre células de cáncer de mama MCF7.

Es de destacar que a concentraciones entre 10-30 μM de este compuesto, no demostró efecto citotóxico sobre las células no malignas ensayadas, mientras que sí mostró tener efecto citotóxico sobre varios tipos diferentes células cancerosas (A549, MCF7 y HTC116).



## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

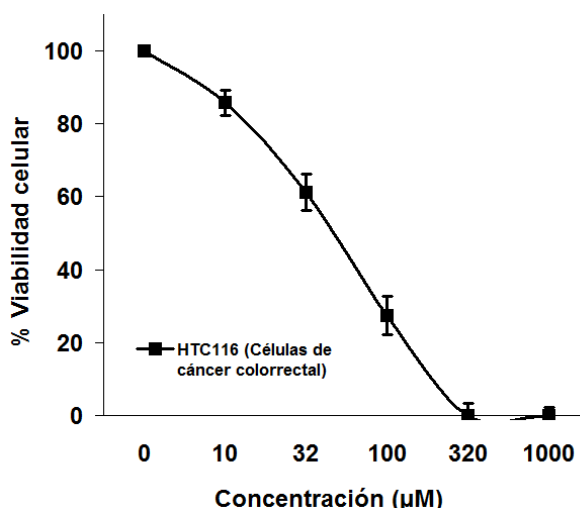


Figura 25. El epoxialquil galactopiranosido posee actividad citotóxica sobre células de cáncer colorrectal HTC116. Tras una exposición de 48 h al compuesto 35, la viabilidad de las células HTC116 fue estimada mediante el ensayo MTT.

En conclusión, los epoxialquil galactopiranosidos (32, 35 y 37) demostraron mayor actividad citotóxica sobre células de cáncer de pulmón A549 que sobre células no malignas de pulmón MRC-5. El compuesto 35 mostró la mayor actividad citotóxica selectiva. Este compuesto generó daño en el ADN como uno de sus mecanismos de citotoxicidad, como se esperaba debido a la presencia de un grupo epóxido en su estructura. La vía de reparación por escisión de nucleótidos (NER) participó en la reparación del daño en el ADN generado por este compuesto, por lo que los cánceres con defectos en esta vía de reparación podrían ser más sensibles a este compuesto. Por otro parte, la inhibición de la glicólisis y la generación de especies reactivas de oxígeno no estuvieron implicadas en la citotoxicidad de este compuesto. Este compuesto también mostró ser más citotóxico frente a células de cáncer de mama MCF7 y de melanoma UACC-62 que frente a células no malignas MCF10 y VH10. Este epóxido también tuvo una marcada actividad citotóxica frente a células HTC116. Estos resultados sugieren que el compuesto 35 posee un posible potencial anticanceroso terapéutico sobre distintos tipos de cánceres. Es necesaria la realización de estudios *in vivo* para continuar evaluando la posible utilidad de este nuevo compuesto en terapéutica.

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 6.2. AZIRIDINIL GALACTOPIRANÓSIDOS.

La aziridina, un heterociclo de tres miembros, es un análogo a epóxido con un nitrógeno reemplazando al oxígeno. La habilidad del ciclo aziridínico de sufrir apertura nucleofílica ha hecho que en química sea ampliamente utilizada para conseguir compuestos nitrogenados, como aminas, alcaloides,  $\beta$ -lactamas, antibióticos, etc<sup>67,68</sup>. Esto hace que la aziridina sea utilizada como producto intermedio para la síntesis de numerosos productos con actividad biológica, incluyendo antitumorales.

El grupo aziridinil se encuentra formando parte de la estructura de algunos agentes alquilantes como el thiotepa (sulfuro tris (1-aziridinil) fosfina)<sup>69</sup> y de compuestos con actividad antitumoral como las azinomicinas<sup>70</sup>. Se sabe que la actividad anticancerosa del thiotepa se debe a la reactividad como electrófilo del anillo aziridinil con nucleófilos endógenos como las bases nitrogenadas del ADN (especialmente guanina). Sin embargo, se desconoce todavía si este compuesto actúa directamente formando entrecruzamientos entre las cadenas del ADN y/o si es hidrolizado en el interior celular originando moléculas de aziridina que reaccionan con el ADN, formando aductos<sup>69</sup>. De cualquier manera, thiotepa ha demostrado utilidad en el tratamiento de ciertos tipos de cáncer de mama, ovario y vejiga. La participación del grupo aziridinil en la actividad anticancerosa de estos compuestos hizo pensar que una nueva serie de derivados galactopiranosidos con una aziridina en su estructura podrían tener actividad anticancerosa (Figura 26). Estos nuevos compuestos aziridínicos fueron sintetizados a partir de alquil  $\beta$ -D-galactopiranosidos<sup>49,50</sup>, empleando las condiciones de Sharpless<sup>71</sup>, por el grupo de investigación de los Drs. Vega Pérez. e Iglesias Guerra.

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

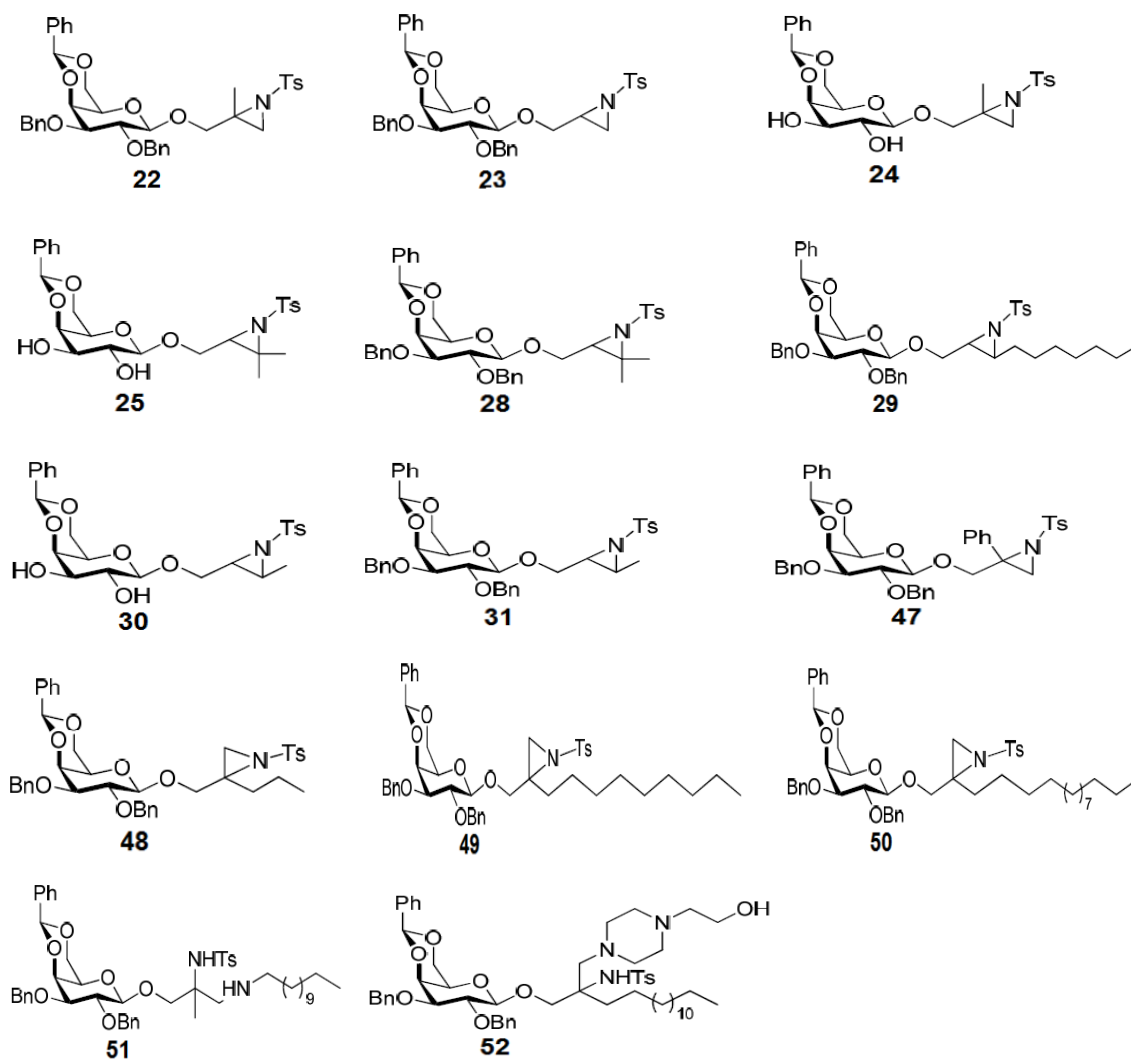


Figura 26. Estructura química de los compuestos galactopiranosidos aziridínicos evaluados.

### 6.2.1. Actividad anticancerosa selectiva de derivados galactopiranosidos aziridínicos.

El primer objetivo fue estudiar si los nuevos compuestos aziridínicos sintetizados por el grupo de los Drs. José M. Vega Pérez y Fernando Iglesias-Guerra, tenían actividad anticancerosa selectiva mediante el ensayo de viabilidad celular MTT. Para este fin, células de adenocarcinoma de pulmón A549 y células no malignas de pulmón MRC-5 fueron expuestas a un amplio rango de concentraciones de los compuestos aziridínicos durante 48 horas. Los resultados obtenidos se encuentran recogidos en la Figura 27 y en la Tabla 4. En total fueron evaluados doce nuevos derivados galactopiranosidos con un grupo aziridinil en su estructura y dos derivados de éstos con el anillo de aziridina abierto.

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

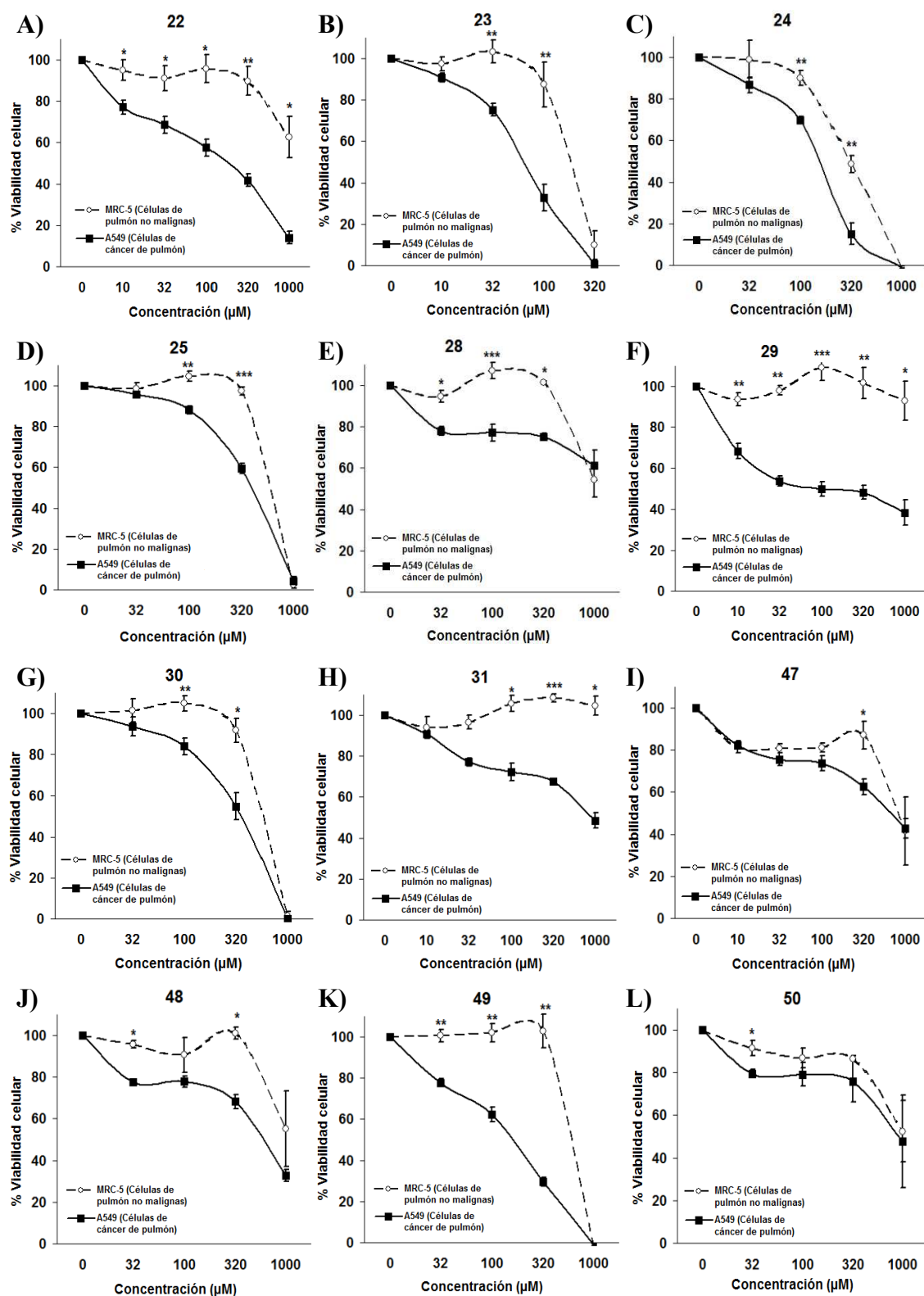


Figura 27. Actividad citotóxica mostrada por derivados galactopiranosidos aziridínicos. Células cancerosas A549 (-■-) y células no malignas MRC-5 (-○-) fueron tratadas durante 48 h y su viabilidad celular medida mediante el ensayo MTT.

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los compuestos con mayor citotoxicidad selectiva fueron los compuestos 22, 23, 29 y 49 (Figuras 27A, 27B, 27F y 27K respectivamente). Aunque los compuestos 23 y 49 presentaron mayor citotoxicidad selectiva sobre células cancerosas desde concentraciones más bajas que los compuestos 22 y 29, fueron estos últimos los únicos que mantuvieron esta selectividad citotóxica hasta concentraciones elevadas.

Los compuestos 24, 25 y 30 presentaron actividad citotóxica (Figuras 27C, 27D y 27G respectivamente), sin embargo, la selectividad mostrada sobre células cancerosas por estos compuestos fue muy ligera. Los compuestos 28, 31, 47 y 48 presentaron una menor actividad citotóxica que el resto de los compuestos ensayados (Figuras 27E, 27H, 27I y 27J, respectivamente). También cabe destacar que los compuestos 51 y 52, que presentaban el anillo aziridinico abierto, demostraron ser más citotóxicos (especialmente el compuesto 52) para las células normales de pulmón MRC-5 que para las células cancerosas de pulmón A549 (Figura 28).

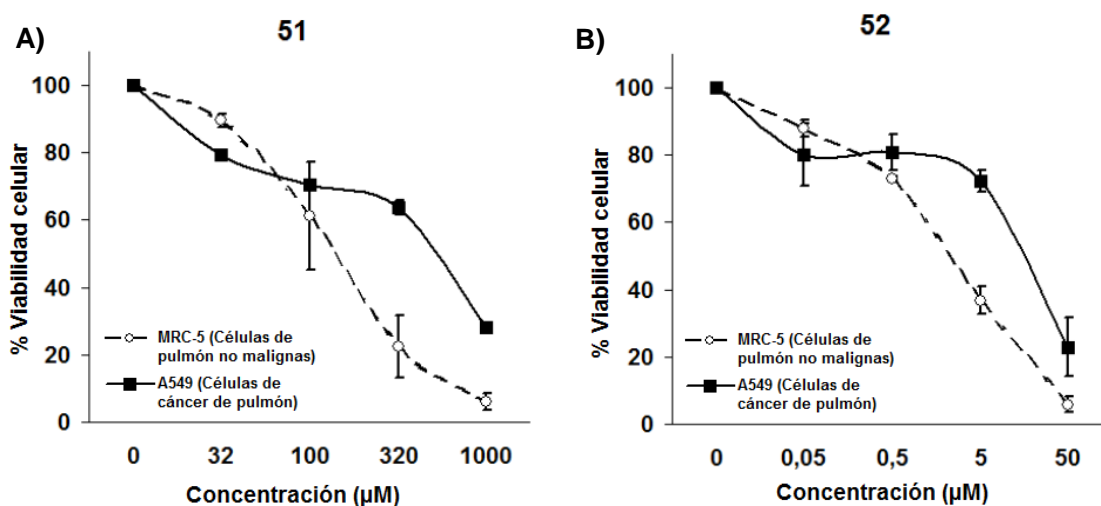


Figura 28. Actividad citotóxica mostrada por derivados galactopiranosidos con el grupo aziridinil abierto. Las células fueron tratadas durante 48 h (ensayo MTT).

De todos los compuestos ensayados, el 22 fue uno de los compuestos con mayor actividad citotóxica selectiva sobre células cancerosas, destacando que esta selectividad fue observada en todas las concentraciones ensayadas. Esta selectividad se mantuvo incluso cuando ambas líneas celulares fueron expuestas a este compuesto durante 72 horas, siendo la IC<sub>50</sub> (media  $\pm$  SEM):  $>1000 \mu\text{M}$  y  $121,4 \mu\text{M} \pm 5,2 \mu\text{M}$  para las células normales MRC-5 y células cancerosas A549, respectivamente. Por este motivo, se decidió continuar con el compuesto 22, cuyo nombre

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

químico es (2-metil-1-tosilaziridin-2-il)metil-2,3-di-O-benzil-4,6-O-(S)-benzilideno-β-D-galactopiranosido, para el estudio del posible mecanismo de acción.

Compuesto	IC <sub>50</sub> (media ± SEM; μM)		p
	MRC-5	A549	
22	> 1000	180,8 ± 42,1	-
23	183,4 ± 19,8	72,8 ± 12,9	**
24	311,7 ± 26,8	153,8 ± 10,0	**
25	567,3 ± 11,6	388,5 ± 15,6	**
28	> 1000	> 1000	-
29	> 1000	235,0 ± 118,1	-
30	543,5 ± 32,0	350,9 ± 63,1	*
31	> 1000	804,1 ± 98,5	-
47	570,3 ± 45,5	599,1 ± 90,7	-
48	793,1 ± 20,1	579,8 ± 53,4	-
49	575,4 ± 31,8	154,6 ± 16,8	***
50	~ 1000	~ 1000	-
51	156,8 ± 50,6	492,4 ± 24,7	*
52	2,2 ± 0,4	15,2 ± 4,0	-

Tabla 4. Valores de IC<sub>50</sub> de los derivados aziridinil galactopiranosidos evaluados.

6.2.2. El compuesto 22 induce daño en el ADN que es reparado mediante escisión de nucleótidos.

Como se ha comentado anteriormente, el principal mecanismo de acción de los compuestos anticancerosos con una aziridina en su estructura, como el thiotepa<sup>69</sup>, es la capacidad que tiene la aziridina para reaccionar con los grupos nucleófilos presentes en el ADN, induciendo entrecruzamientos entre las cadenas del ADN o aductos. Se sabe que las células tienen mecanismos de reparación que intentan restaurar estas lesiones en el ADN, pudiendo llegar a disminuir el efecto citotóxico de estos compuestos. Sin embargo, algunos tipos de cánceres presentan defectos en estas vías de reparación, pudiendo llegar a ser más sensibles al efecto citotóxico de estos fármacos<sup>24</sup>.

Para estudiar la capacidad de generar daño en el ADN del compuesto 22 y los posibles mecanismos implicados en la reparación de dicho daño, se utilizaron las células de ovario de hámster chino AA8 junto a una serie de líneas derivadas de estas células que presentaban deficiencias en alguna de las vías de reparación del daño en el ADN.

El ensayo cometa fue utilizado para la valoración de la capacidad de inducir daño en el ADN por el compuesto 22. Células AA8 fueron expuestas a 50 μM del compuesto 22 durante 4

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

horas. Como se puede observar en la Figura 29, aproximadamente el 30% de las células presentaron daño en el ADN. Este daño fue de una intensidad media puesto que la mayoría de las células que presentaron daño en el ADN, demostraron un moderado valor del parámetro momento cola (parámetro indicativo de daño en el ADN).

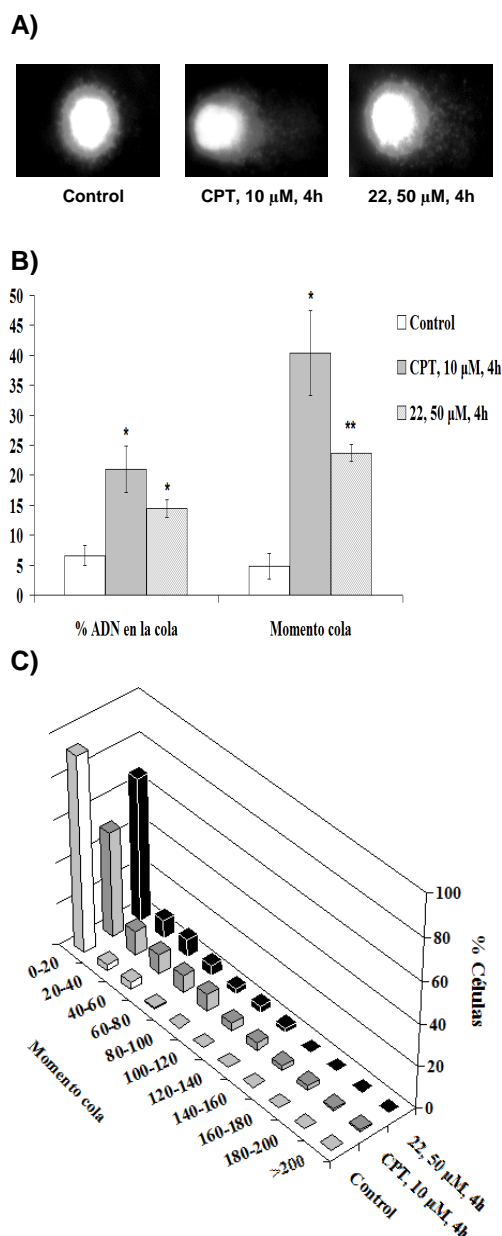


Figura 29. Generación de daño en el ADN por el compuesto aziridínico 22 mediante el ensayo cometa. A) Aspecto de los núcleos de las células no tratadas, de células tratadas con el control positivo camptotecina (CPT) y de células expuestas a 50  $\mu$ M del compuesto 22 después de 4 h de tratamiento. B) Cuantificación del daño en el ADN expresado como porcentaje de ADN en la cola y como momento cola (longitud de la cola X porcentaje de ADN en la cola). C) Representación del momento cola por intervalo de valores frente al porcentaje de células.



## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El siguiente objetivo fue la evaluación de los posibles mecanismos de reparación implicados en la restauración del daño en el ADN inducido por el compuesto 22. Para cumplir con este objetivo, se realizó un ensayo MTT con una serie de líneas celulares deficientes en alguna de las vías de reparación del daño en el ADN. Se comparó la viabilidad celular de las células deficientes frente a la viabilidad de sus correspondientes células parentales (no deficientes) tras la exposición a distintas concentraciones del compuesto 22 durante 24 h. Posteriormente, las células fueron incubadas libres del compuesto durante 48 horas para permitir la acción de los mecanismos de reparación. Finalmente, la viabilidad celular fue medida mediante el ensayo MTT. Las vías HR, NHEJ y BER no estuvieron involucradas en la reparación del daño en el ADN inducido por el compuesto 22 (resultados no mostrados). Sin embargo, los resultados representados en la Figura 30A muestran que células deficientes en NER (UV4 y UV5) fueron más sensibles al efecto citotóxico que células no deficientes (AA8). Los valores de IC<sub>50</sub> (media  $\pm$  SEM;  $\mu$ M) fueron  $319,1 \pm 77,2$ ;  $62,1 \pm 11,1$  y  $38,6 \pm 6,3$  para células AA8, UV4 y UV5 respectivamente. Estos resultados también fueron observados mediante ensayo clonogénico (Figura 30B) cuando células deficientes en NER UV4 y células parentales AA8 fueron expuestos 24 h a 10  $\mu$ M del compuesto 22, dejando 7 días de recuperación para la formación de colonias. Estos resultados confirman la implicación de NER en la reparación del daño generado por el compuesto 22. Teniendo en cuenta que NER es la vía implicada en la reparación de aductos y bucles formados en el ADN y que el grupo aziridinil es el responsable de la generación de aductos en el ADN por el fármaco thiotepa, los resultados aquí obtenidos sugieren que el compuesto 22 podría inducir daño en el ADN en forma de aductos, en cuya reparación estaría involucrada NER.

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

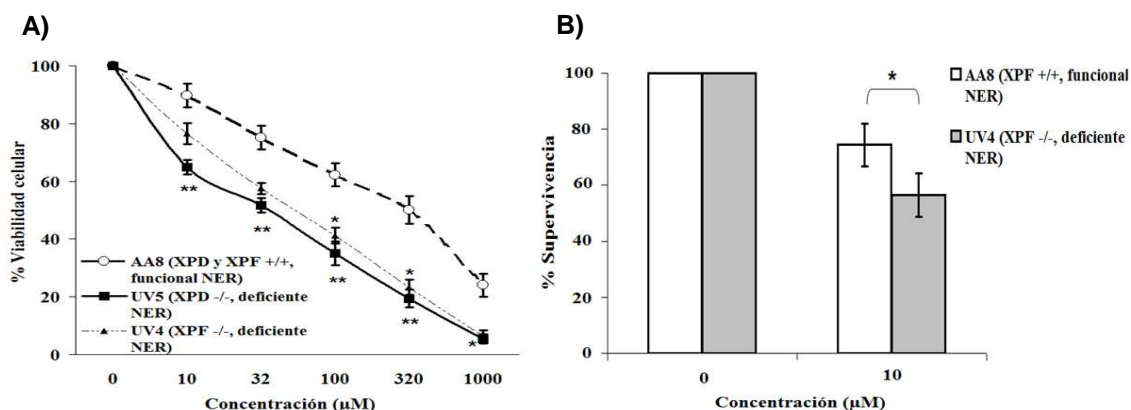


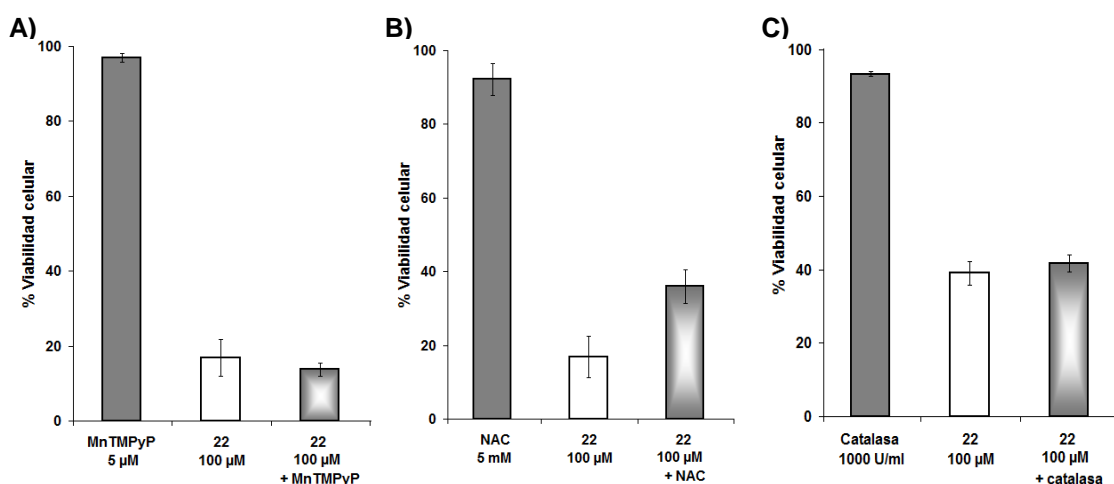
Figura 30. La vía de reparación por escisión de nucleótidos (NER) está implicada en la reparación del daño en el ADN por el compuesto 22. A) Células UV5 (mutadas en XPD; deficientes en NER), células UV4 (mutadas en XPF; deficientes en NER) y células AA8 (células parentales; funcionales en NER) fueron expuestas a varias concentraciones del compuesto 22 por 24 h, y después de 48 h de recuperación, la viabilidad celular fue estimada con el ensayo MTT. B) Porcentaje de supervivencia de células UV4 y AA8 expuestas a 10  $\mu$ M del compuesto 22 por 24 h e incubadas 7 días libres de tratamiento (ensayo clonogénico).

### 6.2.3. Análisis del compuesto 22: formación de EROs e inhibición de la glicólisis.

Las células cancerosas poseen mayores niveles basales de EROs que las células normales<sup>33,36</sup>. También se ha observado que el estrés oxidativo juega un papel importante en la actividad anticancerosa de varios fármacos anticancerosos utilizados en clínica<sup>72,73</sup>. Por este motivo, en los últimos años se ha comenzado a evaluar el uso de agentes prooxidantes para la inducción de niveles específicos de EROs hasta niveles citotóxicos en las células cancerosas sin alcanzar niveles citotóxicos en las células normales. Para evaluar la posible implicación de la generación de EROs como mecanismo implicado en la citotoxicidad selectiva demostrada por el compuesto 22, células A549 fueron incubadas 48 horas con el compuesto 22 en presencia o ausencia de una serie de antioxidantes (MnTMPyP, catalasa y n-acetilcisteína (NAC)), los cuales fueron añadidos una hora antes de la exposición al compuesto 22. Una vez finalizado el tratamiento, la viabilidad celular fue medida mediante el ensayo colorimétrico MTT. A excepción de NAC, ni catalasa ni el compuesto MnTMPyP demostraron disminuir la citotoxicidad inducida por el compuesto 22 (Figura 31). Esta diferencia de prevención de la citotoxicidad dependiendo del antioxidante utilizado sugiere que posiblemente la generación de EROs no está implicada en el efecto citotóxico del compuesto 22. La disminución del efecto citotóxico del compuesto 22 por la presencia de NAC puede ser debida a un mecanismo distinto a la acción antioxidante de NAC. Aunque NAC es un antioxidante que ejerce su acción de forma directa, mediante su capacidad de atrapar EROs, e indirecta, al funcionar como precursor

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

del glutatión<sup>74,75</sup>; también puede reaccionar directamente con compuestos tóxicos electrófilos azufrados, inactivándolos<sup>74</sup>. Esta capacidad de NAC para reaccionar con grupos azufrados podría explicar la disminución observada del efecto citotóxico del compuesto 22 en presencia de NAC, puesto que este compuesto contiene un grupo tosilo en su estructura.



*Figura 31. Papel de la generación de EROs en el mecanismo de citotoxicidad del compuesto 22. Células A549 fueron expuestas al compuesto aziridínico 22 durante 48 h en presencia o ausencia del mimético superóxido dismutasa MnTMPyP (A), de n-acetilcisteína (NAC) (B) y de catalasa (C), los cuales fueron añadidos una hora antes al compuesto 35. A excepción de NAC, los antioxidantes no disminuyeron el efecto citotóxico del compuesto 22.*

Por otra parte, se sabe que las células cancerosas dependen en mayor medida de la glicólisis para su supervivencia que las células normales, y que la inhibición de la glicólisis puede causar efectos anticancerosos selectivos<sup>25,26,76</sup>. Por este motivo, los inhibidores de la glicólisis se están estudiando como posibles compuestos con actividad anticancerosa selectiva. Algunos de estos inhibidores de la glicólisis, como la 2-deoxiglucosa, actúan como falsos sustratos de algunas de las enzimas claves de la glicólisis. Las dos moléculas de galactosa que forman parte de la estructura del compuesto 22 también podrían estar actuando como falsos sustratos de las enzimas glicolíticas, ya que se sabe que la galactosa puede ser transformada en glucosa para su incorporación en la glicólisis. Esta posible inhibición de la glicólisis por el compuesto 22 podría contribuir a la citotoxicidad selectiva sobre células cancerosas mostrada por este compuesto. Para evaluar este posible mecanismo, se midieron las concentraciones de glucosa (producto inicial de la glicólisis) y lactato (producto final de la glicólisis) en células A549 tras un tratamiento de 8 h con el compuesto 22. Sin embargo, los resultados obtenidos indican que la actividad glicolítica de las células A549 no se modifica en presencia de este

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

compuesto, por lo que la inhibición de la glicólisis no parece estar implicada en el efecto citotóxico del compuesto 22 (Figura 32).

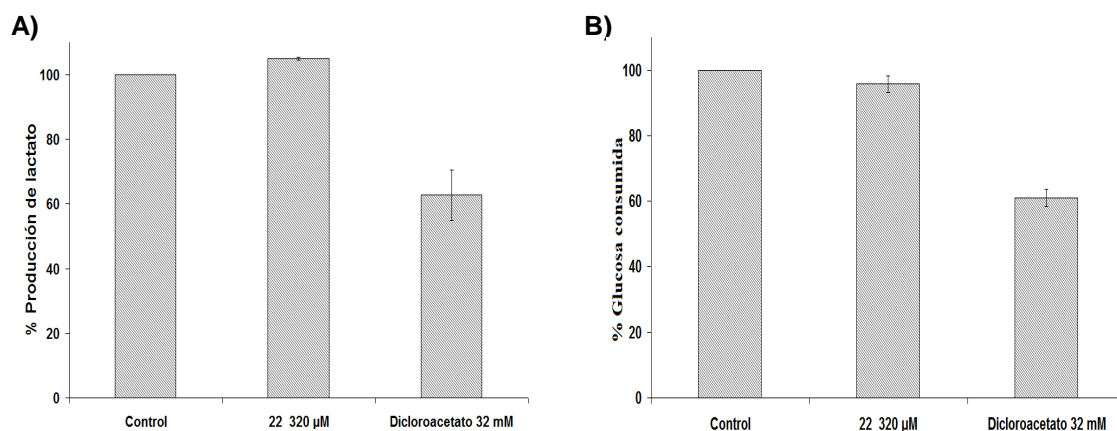


Figura 32. El compuesto 22 no induce inhibición de la glicólisis. A) Porcentaje de producción de lactato y B) porcentaje de consumo de glucosa en células A549 expuestas 8 h al compuesto 22 y dicloroacetato (control positivo) en relación al de las células no tratadas.

### 6.2.4. Evaluación de la combinación del compuesto aziridínico 22 con 5-fluorouracilo y oxaliplatino.

La quimioterapia es la primera línea terapéutica cuando el cáncer se encuentra en fase avanzada. En esta fase, se suelen combinar fármacos anticancerosos para aumentar la eficacia del tratamiento. Previamente a esa combinación, es necesario realizar estudios para asegurarse que existe efecto sinérgico, o al menos aditivo, en la combinación de estos fármacos, porque de lo contrario se estaría produciendo un efecto antagónico, con el consecuente efecto negativo sobre el paciente. Por esta razón, la actividad citotóxica del compuesto 22 fue evaluada en combinación con oxaliplatino y 5-fluorouracilo (5-FU), dos fármacos anticancerosos utilizados en el tratamiento de numerosos tipos de cánceres y que en estos momentos se encuentran en ensayos clínicos II/III para su uso en combinación con otros fármacos en el tratamiento del cáncer de pulmón<sup>77-83</sup> (ver <http://clinicaltrials.gov/>). Células A549 y MRC-5 fueron tratadas 48 h con el compuesto 22, solo o en combinación con 5-FU u oxaliplatino. La viabilidad celular se midió mediante el ensayo MTT. Los resultados obtenidos son recogidos en la Figura 33. Posteriormente, se utilizó el software Compusyn para el cálculo del parámetro Índice de Combinación (CI). El parámetro CI está basado en el método de Chou-Talalay y ofrece una definición cuantitativa para el efecto aditivo (CI=1), sinergismo (CI < 1), y antagonismo (CI > 1)<sup>59</sup>. La combinación del compuesto 22 con 5-FU u oxaliplatino mostró un efecto sinérgico (CI < 1) en la citotoxicidad sobre células cancerosas A549. En otras palabras, el compuesto 22 en

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

combinación con 5-FU u oxaliplatino mató más células cancerosas que cuando estos compuestos fueron utilizados por separado. La viabilidad celular de las MRC-5 no se vio afectada por la combinación de los compuestos.

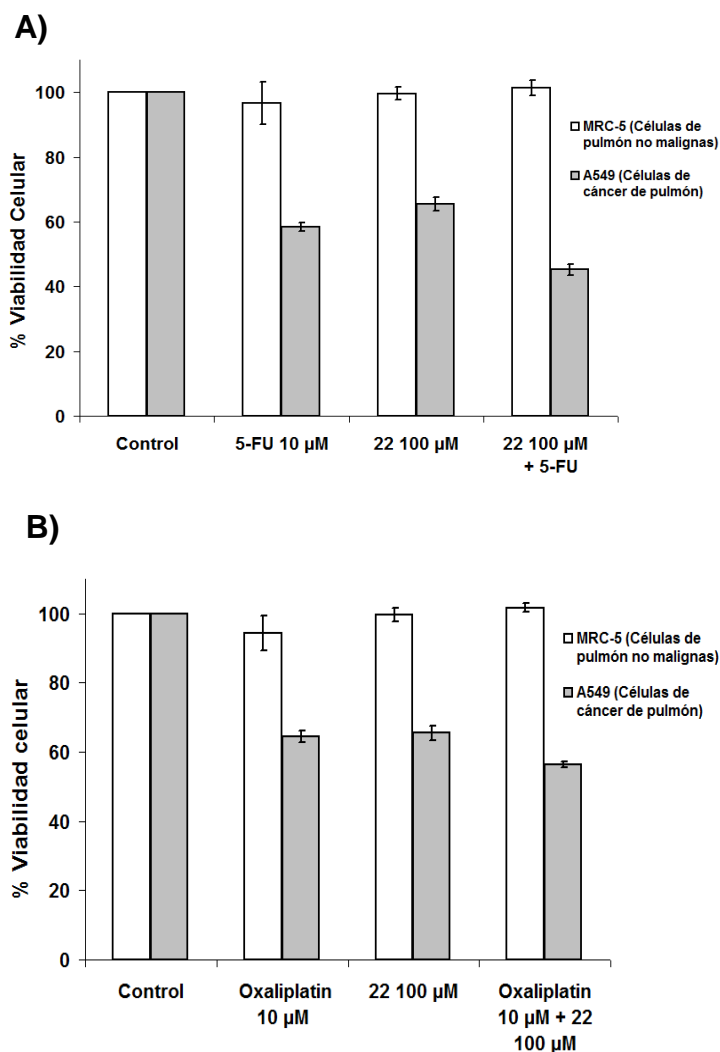


Figura 33. Actividad citotóxica del compuesto aziridínico 22 en combinación con 5-fluorouracilo u oxaliplatino. Las células cancerosas A549 y las células normales MRC-5 fueron expuestas 48 h al compuesto 22, solo o en combinación con 5-fluorouracilo (5-FU) u oxaliplatino. El porcentaje de viabilidad celular (media  $\pm$  SEM) fue determinado mediante el ensayo MTT.

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.2.5. *El compuesto 22 mata de forma selectiva células cancerosas de mama y células de melanoma.*

El compuesto 22 demostró una considerable actividad anticancerosa selectiva frente a células de cáncer de pulmón. Para evaluar si esta selectividad podía ser aplicada a otros tipos de cáncer, diferentes líneas celulares cancerosas y sus correspondientes líneas celulares no malignas fueron expuestas 48 h a distintas concentraciones del compuesto 22. Este compuesto mostró actividad anticancerosa selectiva frente a células de cáncer de mama y células de melanoma (Figura 34).

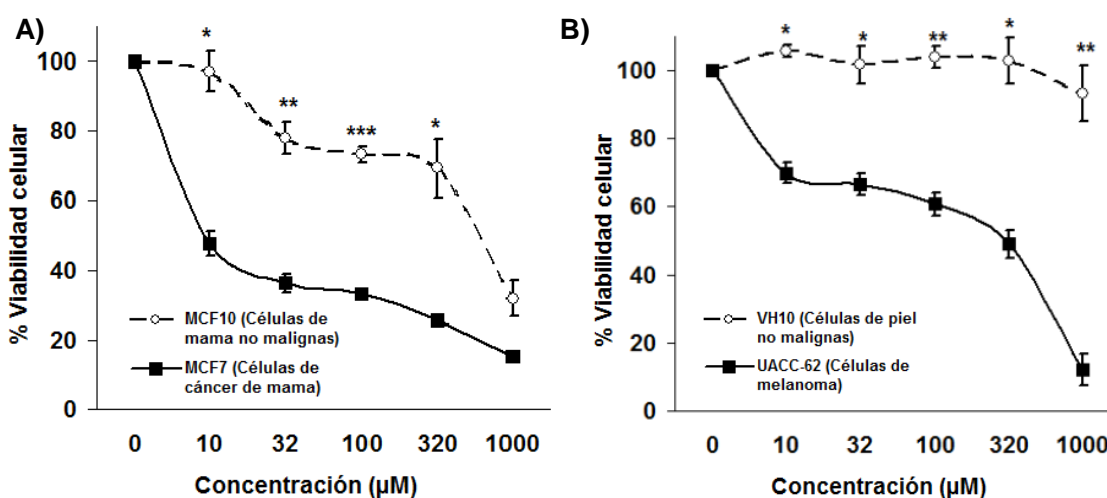


Figura 34. El compuesto 22 mostró actividad anticancerosa selectiva frente a células de cáncer de mama y células de melanoma. Las células fueron tratadas durante 48 h y la viabilidad celular fue medida mediante el ensayo MTT.

En la Figura 34A se puede observar como el compuesto 22 presentó mayor efecto citotóxico sobre células de cáncer de mama MCF7 frente a células no malignas de mama MCF10 desde las concentraciones más pequeñas ensayadas, con un valor de IC<sub>50</sub> (media ± SEM; μM) de  $11,7 \pm 2,0$  y  $567,1 \pm 114,0$  respectivamente. Cabe destacar que el valor de IC<sub>50</sub> para células de cáncer de mama fue casi 50 veces menor que para células normales de mama, mientras que el compuesto cisplatino (fármaco utilizado en el tratamiento del cáncer de mama) no mostró esa elevada selectividad en estas líneas celulares ensayadas (Tabla 5). El compuesto 22 también demostró una mayor actividad citotóxica sobre células de melanoma UACC-62 que sobre células normales de piel VH10 (Figura 34B). Para las células UACC-62, el compuesto 22 tuvo un valor de IC<sub>50</sub> (media ± SEM; μM) de  $264,0 \pm 66,0$  mientras que la viabilidad de las células normales VH10 apenas se vio afectada a las concentraciones ensayadas de este compuesto.

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Compuesto	IC50 (media $\pm$ SEM; $\mu$ M)			
	MCF10	MCF7	VH10	UACC-62
22	567,1 $\pm$ 114,0	11,7 $\pm$ 2,0	> 1000	264,0 $\pm$ 66,0
Cisplatino	23,1 $\pm$ 3,9	25,3 $\pm$ 3,1	-	-
5-FU	< 0,1	0,1 $\pm$ 0,0	> 1000	196,9 $\pm$ 190,1

Tabla 5. Valores de IC50 del compuesto 22 sobre distintas líneas celulares cancerosas y no cancerosas.

Finalmente, también se evaluó la actividad citotóxica del compuesto 22 sobre las células de cáncer colorrectal HTCC116. Tras un tiempo de exposición de 48 h, la viabilidad celular fue medida mediante ensayo MTT. La Figura 35 demuestra que este compuesto también demostró actividad citotóxica sobre este tipo de célula cancerosa, con un valor de IC50 (media  $\pm$  SEM) de 37,5  $\mu$ M  $\pm$  16,8  $\mu$ M.

Todos estos datos demuestran que el nuevo derivado galactopiránosido 22 posee actividad anticancerosa contra diferentes tipos de cáncer, destacando que concentraciones entre 10-320  $\mu$ M mostraron actividad citotóxica frente a todas las líneas cancerosas sin que a esas concentraciones la viabilidad celular de las células no malignas se viera afectada, a excepción de las células normales de mama MCF10, cuya viabilidad estuvo entorno al 75% a las concentraciones más altas.

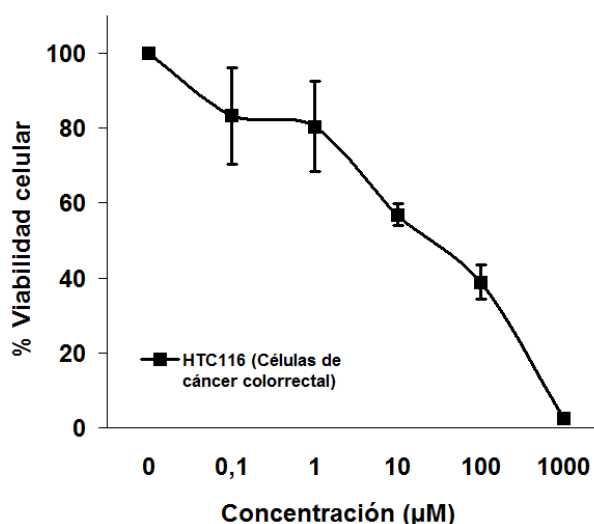


Figura 35. El compuesto 22 posee actividad citotóxica sobre células de cáncer colorrectal HTCC116. Tras una exposición de 48 h al compuesto 22, la viabilidad de células HTCC116 fue evaluada con el ensayo MTT.



## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En resumen, el compuesto 22, un nuevo derivado galactopiranosido con una aziridina formando parte de su estructura, tiene mayor actividad citotóxica frente células de cáncer de pulmón A549, mama MCF7 y melanoma UACC-62 que frente a células no malignas de pulmón MRC-5, mama MCF10 y piel VH10. El mayor efecto citotóxico lo presentó sobre células de cáncer de mama MCF7, con un valor de IC50 entorno a 10  $\mu$ M; mientras que el menor efecto citotóxico lo presentó sobre células normales de piel VH10, cuya viabilidad celular apenas se vio afectada por la exposición a este compuesto en las concentraciones ensayadas. Este compuesto también demostró una marcada actividad citotóxica sobre células de cáncer colorrectal HTC116. A través del ensayo cometa, se observó que este compuesto genera daño en el ADN como uno de sus posibles mecanismos de citotoxicidad. Células deficientes en la vía de reparación por escisión de nucleótidos (NER) fueron más sensibles al efecto citotóxico de este compuesto. Se sabe que ciertos cánceres de pulmón son defectuosos en NER<sup>84-86</sup>, por lo que estos cánceres podrían ser más sensibles al efecto citotóxico de este nuevo compuesto. En el mecanismo de citotoxicidad del compuesto 22, la inhibición de la glicólisis y la formación de especies reactivas de oxígeno no demostraron estar involucradas. A pesar de la notable actividad anticancerosa selectiva *in vitro* que ha demostrado el compuesto 22, es necesario realizar estudios *in vivo* para continuar evaluando la posible utilidad de este nuevo compuesto en terapéutica.

### 6.3. FENILGLIOXAL.

El fenilglioxal (FG) es un compuesto 1,2 dicarbonílico conocido por interactuar con grupos guanidino, como los que forman parte del aminoácido arginina o la base nitrogenada guanina de los ácidos nucleicos. La capacidad que tiene el fenilglioxal para reaccionar con la guanina de los ácidos nucleicos sugiere que este compuesto podría generar daño en el ADN. La generación de daño en el ADN es el mecanismo de acción más común entre los fármacos anticancerosos, por lo que hizo pensar que el FG podría tener actividad anticancerosa. Como el objetivo principal de esta tesis es la búsqueda de nuevos fármacos más selectivos contra el cáncer de pulmón de células no pequeñas, se realizó un ensayo de viabilidad celular para comprobar esta posibilidad. Utilizando células normales de pulmón MRC-5 y células de adenocarcinoma de pulmón A549 se valoró la posible actividad anticancerosa selectiva de FG mediante el ensayo colorimétrico MTT (Figura 6D en el artículo adjunto (Figura 36)). FG demostró una actividad anticancerosa selectiva similar a la demostrada por el cisplatino a la misma concentración.

Para evaluar si realmente FG era capaz de generar daño ADN como sugería su estructura, se realizó el ensayo cometa y el ensayo inmunocitoquímico de formación de focos de  $\gamma$ H2AX

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

(un marcador de daño en el ADN). Como se puede observar en las Figuras 2 y 3 del artículo adjunto (Figuras 37 y 38), el FG demostró inducir daño en el ADN en las concentraciones ensayadas y desde tiempos muy cortos de incubación (2 horas). Este daño fue observado en ambos tipos de ensayos, confirmando que el FG es capaz de generar daño en el ADN. Se sabe que FG y otros compuestos dicarbonílicos son capaces de inactivar directamente a la glutatión peroxidasa, una de las más importantes enzimas antioxidantes, causando un incremento de la producción de  $H_2O_2$  intracelular<sup>87</sup>, el cual se sabe que puede inducir daño en el ADN. Sin embargo, el daño en el ADN inducido por FG no fue debido a la generación de  $H_2O_2$ , puesto que el tratamiento de las células con catalasa no disminuyó el daño en el ADN inducido por fenilglyoxal.

Varios fármacos anticancerosos generan daño en el ADN como su mecanismo de acción. Un ejemplo son los venenos de topoisomerasas, como irinotecán y etopósido, que actúan estabilizando los complejos topoisomerasa-ADN que se forman durante el ciclo catalítico de estas enzimas<sup>88,89</sup>. Las enzimas topoisomerasas (topo) son enzimas necesarias para el desenrollamiento del ADN durante la replicación, transcripción y recombinación, mediante la formación de complejos reversibles con el ADN. Cuando estos complejos ADN-topo son estabilizados por un veneno de topoisomerasa, se van a generar roturas de cadena simple o doble del ADN que pueden desencadenar la muerte celular. Algunos compuestos dicarbonílicos también han sido asociados con la capacidad de actuar como venenos de la topoisomerasa, bien de forma directa, como el clerocidin<sup>90</sup>, o bien al inducir de forma indirecta la producción de  $H_2O_2$ <sup>87</sup>. El FG es un compuesto dicarbonílico por lo que también podría estar actuando sobre las topoisomerasas (topos), siendo el posible mecanismo responsable de la generación de daño en el ADN por este compuesto. Mediante la técnica TARDIS, se evaluó la posible actividad de FG sobre las topoisomerasas. FG demostró ser capaz de inducir complejos ADN-topo I o topo II en las células que fueron expuestas a altas concentraciones de FG (Figura 4 en el artículo adjunto (Figura 39)). Estos complejos solamente pudieron ser observados cuando el tiempo de exposición fue largo (24h). Cabe destacar que la presencia de catalasa evitó la formación de estos complejos, indicando la participación del  $H_2O_2$  en la formación de dichos complejos por FG.

Estudios recientes han observado que las topoisomerasas juegan un papel importante en la fragmentación del ADN durante la apoptosis<sup>91,92</sup>. Para descartar si los complejos observados de ADN-topo tras el tratamiento con FG se debían a un envenenamiento de las topoisomerasas o al desencadenamiento de apoptosis, se realizó citometría de flujo usando el kit de Anexina V-FITC. Con este ensayo se observó que FG inducía apoptosis (Figuras 6A y 6B en el artículo adjunto (Figura 36)) a los tiempos de exposición y concentraciones en las que se observaron

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

complejos ADN-topo, indicando que estos complejos se debían principalmente al proceso de apoptosis.

Con el objetivo de estudiar el tipo de daño en el ADN que estaba siendo generado por FG, su citotoxicidad fue evaluada sobre una serie de líneas celulares deficientes en algunas de las vías de reparación del daño genético (Figura 5 en el artículo adjunto (Figura 40)). Células deficientes en NER, NHEJ o HR demostraron ser más sensibles a FG que sus respectivas células control (no deficientes). La participación de NER en la reparación de la lesión inducida por FG sugiere que este compuesto puede inducir distorsiones en forma de bucle del ADN. Mientras que la participación de NHEJ o HR en la reparación del daño por FG, junto con la formación de focos de  $\gamma$ H2AX (comentada anteriormente) sugieren que el FG induce roturas de doble cadena ya que estas dos vías de reparación son la defensa principal contra roturas de doble cadena y la H2AX es una histona encargada de señalar las lesiones de roturas de doble cadena para su reparación. Estos resultados sugieren que la formación de roturas de doble cadena juega un papel fundamental en la citotoxicidad del fenilglioxal.

Anteriormente se comentó que la generación de  $H_2O_2$  por FG era responsable de la formación de complejos ADN-topo. Para comprobar si  $H_2O_2$  jugaba un papel en la citotoxicidad de FG, células cancerosas fueron expuestas a FG en presencia o ausencia de catalasa. Esta enzima demostró reducir parcialmente la citotoxicidad inducida por FG (Figura 6C en el artículo adjunto (Figura 36), indicando que  $H_2O_2$  participa en la actividad citotóxica de FG.

Resumiendo, FG tiene actividad anticancerosa *in vitro* contra el cáncer de pulmón. Esta actividad es mediada, al menos en parte, por la inducción de lesiones en el ADN y por la generación de  $H_2O_2$ . Por otra parte, esta actividad anticancerosa podría ser más marcada en cánceres con deficiencias en las vías de reparación involucradas en la reparación del daño en el ADN generado por FG. Sin embargo, es necesaria la realización de estudios *in vivo* en animales para poder evaluar el posible potencial anticanceroso de FG en cáncer de pulmón.

La capacidad para dañar el ADN del FG y su actividad anticancerosa selectiva han sido recogidas en el artículo titulado *Guanidine-reactive agent phenylglyoxal induces DNA damage and cancer cell death* que se encuentra publicado en *Pharmacological Reports* (2012) y es adjuntado a continuación para mayor detalle de los datos comentados anteriormente.

## **6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**



## Guanidine-reactive agent phenylglyoxal induces DNA damage and cancer cell death

José M. Calderón-Montaña<sup>1\*</sup>, Estefanía Burgos-Morón<sup>1\*</sup>, Manuel L. Orta<sup>2</sup>, Nuria Pastor<sup>2</sup>, Concepción Perez-Guerrero<sup>1</sup>, Caroline A. Austin<sup>3</sup>, Santiago Mateos<sup>2</sup>, Miguel López-Lázaro<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Pharmacology, Faculty of Pharmacy, University of Seville, Profesor García González 2, 41012, Seville, Spain

<sup>2</sup>Department of Cell Biology, Faculty of Biology, University of Seville, Avda. Reina Mercedes 6, 41012, Seville, Spain

<sup>3</sup>Institute for Cell and Molecular Biosciences, The Medical School, University of Newcastle upon Tyne, Framlington Place, Newcastle upon Tyne NE2 4HH, United Kingdom

**Correspondence:** Miguel López-Lázaro, e-mail: mlopezlazaro@us.es

---

### Abstract:

**Background:** DNA-damaging compounds (e.g., alkylating agents, cytotoxic antibiotics and DNA topoisomerase poisons) are the most widely used anticancer drugs. The inability of tumor cells to properly repair some types of DNA damage may explain why specific DNA-damaging drugs can selectively kill tumor cells. Phenylglyoxal is a dicarbonyl compound known to react with guanidine groups such as that of the DNA base guanine, therefore suggesting that phenylglyoxal could induce DNA damage and have anticancer activity.

**Methods:** Cellular DNA damage was measured by the alkaline comet assay and the  $\gamma$ H2AX focus assay. Formation of topoisomerase I- and topoisomerase II-DNA complexes was assessed by the TARDIS assay, an immunofluorescence technique that employs specific antibodies to DNA topo I or topo II to detect the protein covalently bound to the DNA in individual cells. Cell growth inhibition and cytotoxicity were determined by XTT, MTT and clonogenic assays. Apoptosis was assessed by the Annexin V flow cytometry assay.

**Results:** Phenylglyoxal induced cellular DNA damage and formation of high levels of topoisomerase I- and topoisomerase II-DNA complexes in cells. These topoisomerase-DNA complexes were abolished by catalase pretreatment and correlated well with the induction of apoptosis. Phenylglyoxal-induced cell death was partially prevented by catalase pretreatment and was higher in lung cancer cells (A549) than in normal lung fibroblasts (MRC5). Mammalian cell lines defective in nucleotide excision repair (NER), homologous recombination (HR) and non-homologous end joining (NHEJ) were more sensitive to phenylglyoxal than parental cells; this suggests that phenylglyoxal may induce bulky distortions in the shape of the DNA double helix (which are repaired by the NER pathway) and DNA double-strand breaks (which are repaired by HR and NHEJ).

**Conclusion:** This report shows that phenylglyoxal is a new DNA-damaging agent with anticancer activity, and suggests that tumor cells with defects in NER, HR and NHEJ may be hypersensitive to the cytotoxic activity of phenylglyoxal.

### Key words:

DNA damage response, DNA topoisomerases, nucleotide excision repair, non-homologous end joining, homologous recombination

---

---

\*J.M. Calderón-Montaña and E. Burgos-Morón contributed equally to this work.

---

## Introduction

DNA-damaging compounds are the most widely used anticancer drugs. The basis for the selective anticancer activity of DNA-damaging drugs such as alkylating agents, cytotoxic antibiotics and DNA topoisomerase poisons has been enigmatic for many years [30]. Recent evidence suggests that the elevated levels of DNA damage in tumor cells and their inability to properly repair some types of DNA damage may explain why tumor cells are often more vulnerable than normal proliferating cells to these chemotherapeutic agents. Currently, the identification of DNA repair defects in tumor cells and the discovery of DNA repair inhibitors in combination with agents that induce specific types of DNA damage are active areas of scientific investigation that may help rationalize and improve cancer chemotherapy [6, 15].

DNA topoisomerases (topos) are essential nuclear enzymes that govern DNA topology. They solve the topological problems associated with DNA replication, transcription, recombination, and chromatin remodeling by introducing transitory single- or double-strand breaks in the DNA. Topo I and topo II are the targets of several clinically useful anticancer drugs, including etoposide and the camptothecin derivatives topotecan and irinotecan. These drugs, known as topoisomerase poisons, stabilize the normally transient topo-DNA complexes formed during the catalytic cycle of the enzyme; then, cellular processing converts these complexes into permanent DNA strand breaks that trigger cell death [18, 19, 22, 31].

Phenylglyoxal is a 1,2-dicarbonyl compound known to interact with guanidine groups, such as those of the amino acid arginine and of the DNA base guanine. It is used, for instance, for specific modification of arginine residues in proteins and for determination of guanine and its nucleosides and nucleotides [7, 24, 29]. The ability of phenylglyoxal to interact with the DNA base guanidine suggested that this compound could induce DNA damage. Two other lines of evidence suggested that phenylglyoxal could induce topoisomerase-mediated DNA damage. First, the topo II poison clerocidin contains a dicarbonyl function (like phenylglyoxal) that seems to participate in its ability to induce topo II-mediated DNA damage [1, 5]. In addition, phenylglyoxal and other dicarbonyl compounds have been found to directly inactivate glutathione peroxidase resulting in an increase in intracellular hydrogen peroxide production [20], and

hydrogen peroxide is known to induce topo I- and topo II-mediated DNA damage [4, 8]. The results reported in this work indicate that phenylglyoxal induces DNA damage and cancer cell death, and suggest that tumor cells with defects in specific DNA repair pathways may be hypersensitive to the cytotoxic activity of phenylglyoxal.

---

## Materials and Methods

### Chemicals and cell lines

Phenylglyoxal, etoposide, camptothecin, cisplatin, curcumin, hydrogen peroxide and catalase were purchased from Sigma. Human K562 leukemia cells were maintained as a suspension culture in RPMI 1640 medium supplemented with 10% fetal bovine serum and penicillin (50 µg/ml)/streptomycin (50 µg/ml). The human A549 lung cancer cell line and the human embryo lung fibroblastic MRC-5 cell line were maintained in DMEM supplemented with 2 mM glutamine, 50 µg/ml penicillin, 50 µg/ml streptomycin and 10% fetal bovine serum. To study the DNA damage response induced by phenylglyoxal, a parental (AA8) and several DNA repair-deficient Chinese hamster ovary cell lines, including UV4, UV5, UV61 (nucleotide excision repair, NER), EM9 (base excision repair, BER) and V3-3 (non-homologous end joining, NHEJ) were used. The homologous recombination (HR)-deficient VC8 cell line (V79 Chinese hamster lung cells mutated in BRCA2) and the VC8B2 cell line (VC8 cells complemented with human BRCA2) were also used. The DNA repair-deficient cell line UV4 is mutated in ERCC1 (human homologous: XPF), the UV5 in ERCC2 (XPD), the UV61 in ERCC6 (CSB), the EM9 in XRCC1 (DNA ligase III), the V3-3 in XRCC7 (DNA-PK) and the VC8 in BRCA2 [2, 16]. These DNA repair-deficient cell lines, kindly provided by Dr. Thomas Helleday, were cultured in DMEM. All cell lines were cultured at 37°C in a humidified atmosphere containing 5% CO<sub>2</sub>. Cell culture reagents were obtained from Life Technologies.

### Cell proliferation assays

The XTT and MTT assays are colorimetric techniques that allow the quantitative determination of cell viability.

ity. They are based on the capability of viable cells to transform the XTT salt (sodium 3'-[1-(phenylamino-carbonyl)-3,4-tetrazolium]-bis(4-methoxy-6-nitro) or the MTT salt (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide) into formazan dyes. Exponentially growing cells were seeded into 96-well plates and drugs were added 24 h later. In the XTT assay, following an incubation period of 5 days, cell viability was quantified using an XTT cell proliferation kit assay (Roche, Mannheim, Germany). After drug exposure, plates were incubated for 4 h with XTT before reading them on a Bio-Rad 550 plate reader at 450 nm. In the MTT assay, following an incubation period of 2 days, medium was removed and 125  $\mu$ l MTT (1 mg/ml in medium) was added to each well for 5 h. Then, 80  $\mu$ l 20% SDS in 0.02 M HCl were added, plates were incubated for 10 h at 37°C, and optical densities were measured at 540 nm on a multi-well plate spectrophotometer reader. In both assays, cell viability was expressed as percentage in relation to controls. All data were averaged from at least three independent experiments and were expressed as the means  $\pm$  standard error of the means (SEM).

#### Clonogenic assay

Cells were seeded into 9-cm plates and, after treatments and drug removal, they were incubated at 37°C for 9 days. The medium was then aspirated and dishes were fixed in methanol, stained with 0.4% methylene blue for 10 min, rinsed and air-dried. Surviving colonies made up of more than 50 cells per colony were counted. Survival data are shown for correction for untreated cell cloning efficiencies.

#### Comet assay

The single cell gel electrophoresis assay (comet assay) is a sensitive technique for the detection of DNA damage in cells and has been described in detail by Singh et al. [25]. We followed this protocol with minor modifications described previously [21]. Briefly, standard slides were immersed in 1% normal melting agarose at 55°C, left to allow the agarose to solidify and kept at 4°C until use. After cell treatments, approximately 10,000 cells were mixed with 85  $\mu$ l of low-melting agarose (LMA) at 37°C. This mixture was rapidly pipetted onto the slides with the first agarose layer, spread using a coverslip and kept at 4°C for 8 min to allow the LMA to solidify. The coverslips

were then removed and a third layer of 100  $\mu$ l LMA at 37°C was added, covered with a coverslip and allowed to solidify at 4°C for 8 min. After removing the coverslips, cells were incubated in the dark for 1 h at 4°C in a lysis solution containing 10 mM Tris-HCl, 2.5 M NaCl, 100 mM Na<sub>2</sub>-EDTA, 0.25 M NaOH, 1% (v/v), Triton X-100 and 10% (v/v) DMSO, pH 12.0. In order to unwind the DNA, the slides were incubated for 20 min in an electrophoretic buffer containing 1 mM Na<sub>2</sub>-EDTA and 300 mM NaOH, pH 12.8. Electrophoresis was carried out at 1 V/cm for 20 min. After neutralization with 3  $\times$  5 min washes of 0.4 M Tris-HCl pH 7.5 to remove alkali and detergent, cells were stained with the fluorochrome 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) in Vectashield (mounting medium for fluorescence H-1000, Vector Laboratories, Peterborough, UK). Images of 50 randomly selected cells from each sample were analyzed using the "comet score" software. DNA damage was calculated for each comet and was expressed as % of DNA in the tail and as tail moment (defined as the product of the tail length and the fraction of total DNA in the tail).

#### Immunofluorescence $\gamma$ -H2AX focus assay

The immunofluorescence  $\gamma$ -H2AX focus assay is a sensitive technique to evaluate DNA damage. It is based on the ability of double-strand breaks (DSBs) to trigger phosphorylation of histone H2AX on Ser-139, which leads to the formation of nuclear foci that can be visualized with anti- $\gamma$ H2AX antibodies [9, 32]. After treatments, K562 cells were pelleted at 1,200 rpm for 5 min, washed two times with PBS, resuspended and incubated in cold pure methanol for 20 min. They were then centrifuged, resuspended in 200  $\mu$ l methanol, dropped onto coverslips and allowed to dry. AA8 cells were seeded on coverslips and allowed to attach for 24 h. After treatments, AA8 cells were washed three times with PBS, fixed with 4% paraformaldehyde in PBS for 10 min at room temperature and washed three times with PBS. After fixation, K562 cells and AA8 cells were permeabilized with 0.5% Triton X-100 in PBS for 5 min and then blocked three times with 0.1% Tween 20, 1% BSA in PBS for 5 min each. Cells were then incubated for 1 h with a mouse anti- $\gamma$ H2AX monoclonal antibody (Upstate, 1:800 dilution). Cells were washed three times with PBS and blocked three times prior to the incubation with a secondary anti-mouse antibody linked to Alexa Fluor 488 (Invitrogen, 1:500 dilution) for 1 h. Cells were



washed with PBS, blocked and washed again with PBS as indicated before. DNA was stained with DAPI and immunofluorescence was observed at 40-fold magnification with an Olympus BX 61 microscope. A total of ~200 cells/dose were scored, and cells with 10 or more foci were scored as positive.

### TARDIS assay

This immunofluorescence technique employs specific antibodies to DNA topo I or topo II to detect the protein covalently bound to the DNA in individual cells. Anti-topo II polyclonal antibody  $\alpha$ CT was raised in rabbits to recombinant topo II $\alpha$  (C-terminal fragment) and detected both the  $\alpha$  and  $\beta$  isoforms of topo II. For topo I, a polyclonal human antibody (2012, Topogen) was used. Antibodies were diluted in PBS containing 0.1% Tween 20 and 1% BSA (bovine serum albumin).  $\alpha$ CT (topo II) was used at a 1:50 dilution and 2012 (topo I) at 1:1,000. An anti-rabbit FITC-conjugated second antibody (1262, Sigma) was used at 1:200 dilution for topo II antibody, and a goat anti-human FITC-conjugated second antibody (F5512, Sigma) was used at 1:50 dilution for topo I [3, 12, 33]. The TARDIS assay has been described in detail previously [3, 12, 33]. Briefly, cells were seeded ( $3 \times 10^4$  cells/well) into six-well tissue culture plates. These were grown for 48 h and drugs were added to exponentially growing cells at several concentrations. Microscope slides were precoated with agarose, and drug-treated or untreated cells (control) were immediately embedded in agarose and spread onto the slide. Slides were then placed in lysis buffer containing protease inhibitors for 30 min (after this stage slides could be stored at  $-20^\circ\text{C}$  in PBS containing 10% glycerol), followed by 30 min in 1 M NaCl plus protease inhibitors. Slides were then washed three times in PBS (5 min/wash) and exposed to primary antisera for 1 to 2 h. Slides were washed three times in PBS containing 0.1% Tween 20 (PBST) and subsequently exposed for 1 to 2 h to a secondary antibody (anti-rabbit fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated secondary antibody, F(ab')<sub>2</sub> fragment; Sigma). Slides were washed three times in PBST followed by an overnight wash in PBS containing protease inhibitors, at  $4^\circ\text{C}$ . Slides were stained with Hoechst 33258 (10  $\mu\text{M}$  in PBS; Sigma) for 5 min and cover slips were applied and secured. Images of blue (Hoechst-stained DNA) fluorescence and green (FITC-stained covalently bound topo-DNA) immunofluorescence were then captured

with an epifluorescence microscope attached to a cooled slow scan charge-coupled device camera. For each of the ~eight randomly chosen fields of view, images of blue and green fluorescence were captured to give a total of ~100 cells/dose. Images were then analyzed to quantify the levels of Hoechst (blue) fluorescence and FITC (green) immunofluorescence with Imager 2 software (Astrocam, Cambridge, UK) based on Visilog 4 (Noesis, Paris, France). All images were corrected for stray light and camera background. Additionally, images were subjected to blue and green shade correction to compensate for variation in intensity of illumination and non uniformities in light transmission [3, 12, 33].

### Annexin V-FITC apoptosis detection assay

Apoptosis was quantified by flow cytometric analysis (Cytomics FC 500 MPL, Beckman Coulter; CXP analysis) using Annexin V-FITC apoptosis detection kit (Cat. no.: 556547, BD Biosciences) according to the manufacturer's instructions.

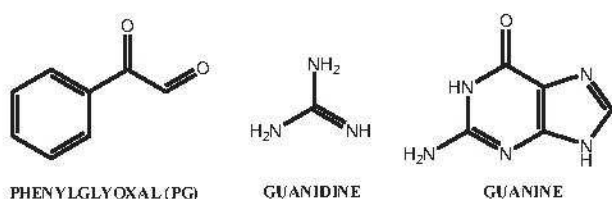
### Statistical analysis

For statistical analysis we used the *t*-test (paired, two-tailed). A *p*-value  $> 0.05$  is not considered statistically significant and is not represented by any symbol. A *p*-value  $< 0.05$  is considered to correspond with statistical significance and is indicated with an asterisk (\*), a *p*-value  $< 0.01$  is indicated with a double asterisk (\*\*), and a *p*-value  $< 0.001$  is indicated with a triple asterisk (\*\*\*).

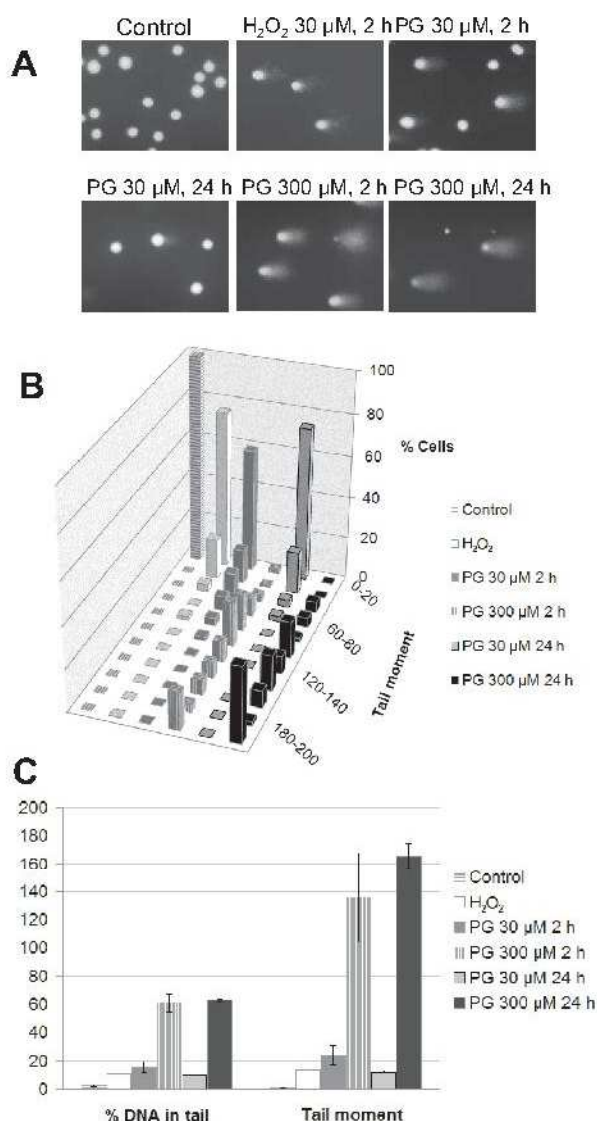
## Results

### Phenylglyoxal induces cellular DNA damage

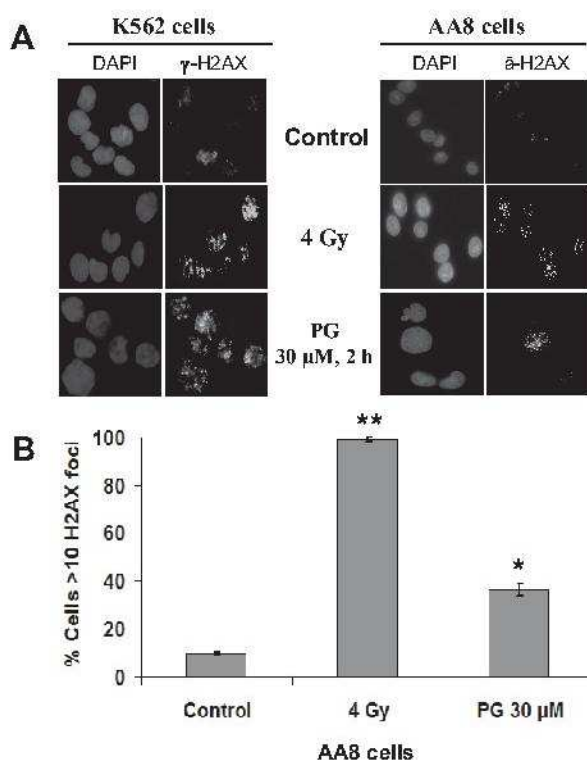
Because phenylglyoxal is known to react with guanine groups such as that of the DNA base guanine (Fig. 1), we hypothesized that this compound could induce DNA damage. To test such a hypothesis, we employed two standard methods commonly used for DNA damage detection: the comet assay and the  $\gamma$ -H2AX focus assay. To select an appropriate concentration range, K562 leukemia cells were first exposed for 5 days to several concentrations of phenylglyoxal



**Fig. 1.** Chemical structure of phenylglyoxal, guanidine and the DNA base guanine



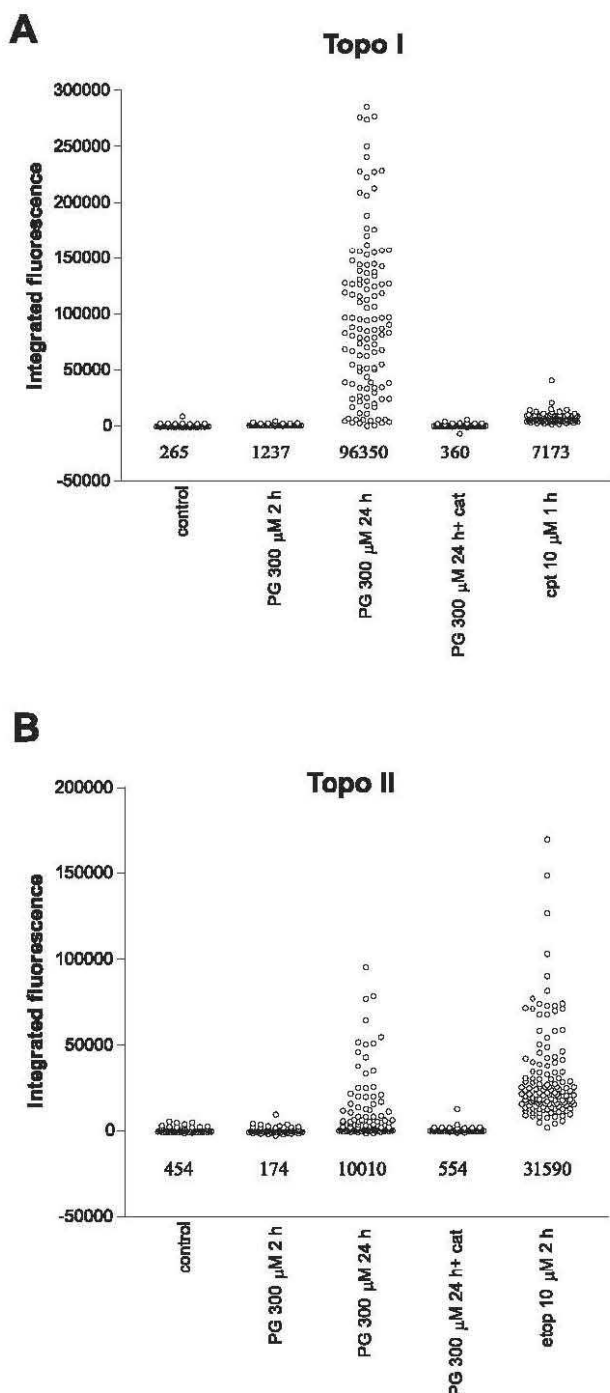
**Fig. 2.** Assessment of phenylglyoxal (PG)-induced DNA damage in K562 cells by the comet assay. **(A)** Representative photographs of untreated cells, of cells treated with the positive control hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 30 μM, 2 h), and of cells exposed for 2 h and 24 h to phenylglyoxal 30 μM and 300 μM. **(B)** Distribution of cells in the different intervals of values of tail moments (data are averaged from three independent experiments). **(C)** Quantification of DNA damage expressed as % of DNA damage in tail and as tail moment (tail length x percentage of DNA in the tail)



**Fig. 3.** Assessment of phenylglyoxal (PG)-induced DNA damage in K562 cells and AA8 cells by the immunofluorescence γ-H2AX focus assay. **(A)** Representative photographs of control cells, of cells irradiated with an X-ray device (Philips MU 15F) at a dose of 4 Gy (positive control), and of cells exposed for 2 h to PG 30 μM. **(B)** Quantification of nuclear foci in non-malignant AA8 cell exposed to X-ray (4 Gy) and PG (30 μM, 2 h)

and cell viability was estimated with the XTT assay, obtaining an IC<sub>50</sub> value of 34.32 ± 0.07 (μM ± SEM). K562 cells were then exposed to two concentrations of phenylglyoxal (30 and 300 μM) for 2 h and 24 h, and DNA damage was assessed with the comet assay. Three independent experiments revealed that K562 leukemia cells exposed for 2 h and 24 h to both concentrations of phenylglyoxal had higher levels of DNA damage than untreated cells. Representative photographs of cells exposed to each treatment with phenylglyoxal, the percentage of cells within different ranges of DNA damage, and the quantification of DNA damage are illustrated in Figure 2.

We used the γ-H2AX focus assay to confirm that phenylglyoxal could induce DNA damage at low concentrations and short exposure times. Three independent experiments revealed that K562 leukemia cells exposed for 2 h to 30 μM phenylglyoxal had higher levels of fluorescence than untreated cells (Fig. 3A). Because the background signal in these cancer cells



**Fig. 4.** Phenylglyoxal induces topo I- and topo II-DNA complexes in K562 cells mediated by hydrogen peroxide. K562 cells were treated with PG 300  $\mu$ M (2 h and 24 h), in the presence and absence of catalase (cat), and the levels of topo I- and topo II-DNA complexes were evaluated with the TARDIS assay. Catalase (cat, 1,000 U/ml) was added 0.5 h before phenylglyoxal. Y-axes show integrated fluorescence values, which indicate cellular levels of topo-DNA complexes (arbitrary units). All experiments were done in triplicate. Plots show one representative experiment, in which the levels of topo I-DNA complexes (**A**) and topo II-DNA complexes (**B**) can be observed in individual cells. The mean fluorescence values of this representative experiment are also shown. Camptothecin (cpt) and etoposide (etop) were used as topo I and topo II positive controls

was relatively high and the number of foci could not be properly quantified, we used the non-malignant AA8 cell line to confirm the results. The  $\gamma$ -H2AX focus assay revealed that phenylglyoxal (30  $\mu$ M, 2 h) significantly increased the number of foci (indicative of DNA damage) in AA8 cells, although such increase was lower than the observed in cells irradiated with an X-ray device (Philips MU 15F) at a dose of 4 Gy (Fig. 3B and 3C).

#### Phenylglyoxal induces topoisomerase I- and topoisomerase II-DNA complexes in cells. Involvement of hydrogen peroxide

Topoisomerase poisons are a group of antitumor drugs that kill cancer cells by inducing topoisomerase-mediated DNA damage [17, 19, 22]. Since previous evidence suggested that phenylglyoxal might induce topoisomerase-mediated DNA damage (discussed in the introduction section), we investigated the ability of phenylglyoxal to induce topo-DNA complexes in individual cells with the TARDIS assay. Although the sensitivity of this technique for detecting topo-DNA complexes is higher than that of other cell-based assays, this assay usually requires drug concentrations approximately 10-fold higher than the  $IC_{50}$  in cell viability assays to observe a clear activity [14]. Three independent experiments revealed that K562 leukemia cells exposed for 2 h to phenylglyoxal 300  $\mu$ M did not develop significant levels of topo I- or topo II-DNA complexes. High levels of both topo I- and topo II-DNA complexes were observed, however, when the cells were exposed to phenylglyoxal 300  $\mu$ M for 24 h. Because phenylglyoxal can generate hydrogen peroxide [20], which can induce topo-DNA complexes in cells [12], we evaluated if catalase pretreatment could reduce the levels of topo-DNA complexes induced by phenylglyoxal. Figures 4A and 4B show that catalase pretreatment abolished the formation of topo I- and topo II-DNA complexes induced by phenylglyoxal, indicating that hydrogen peroxide mediates this activity.

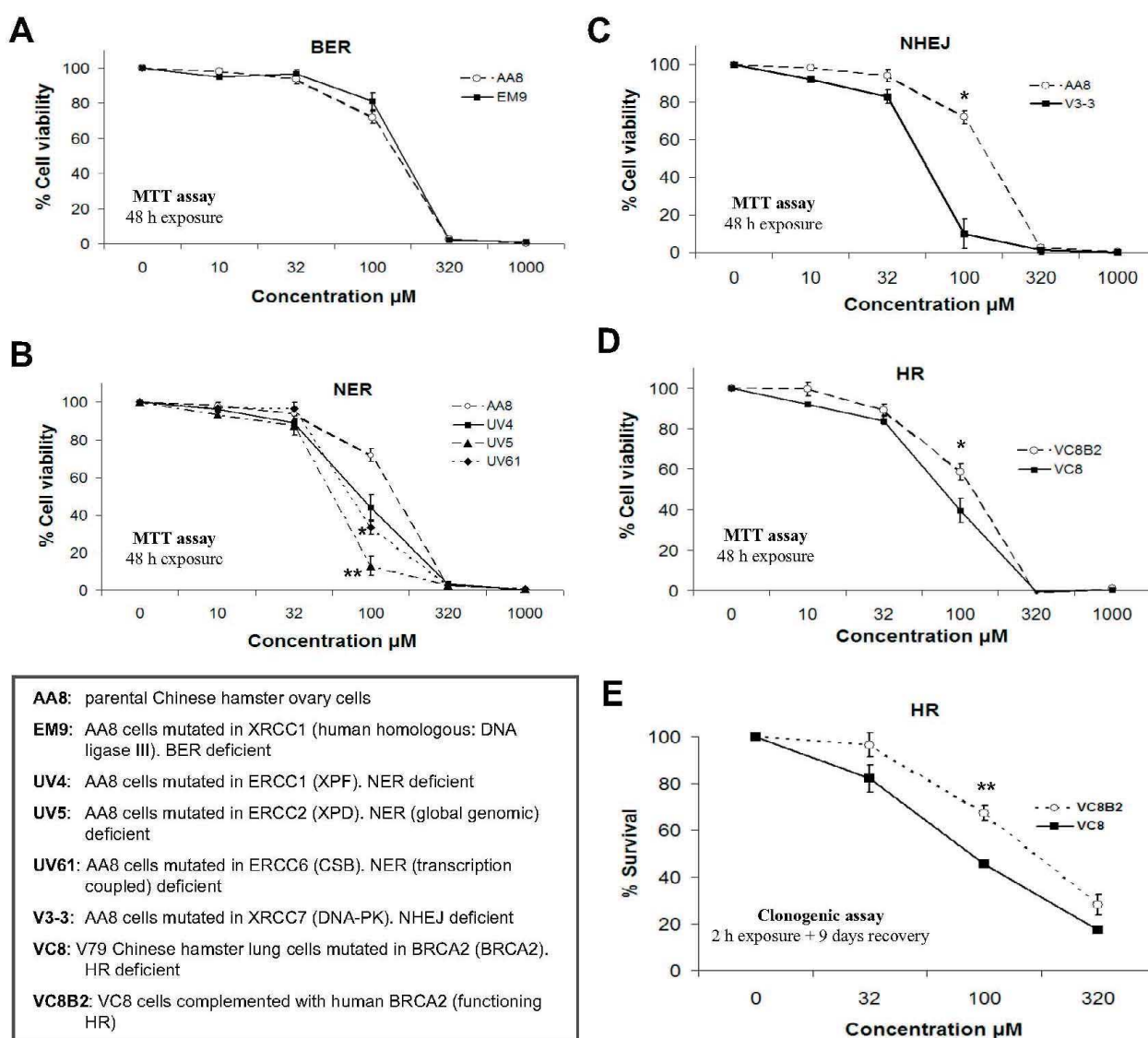
#### Cells deficient in nucleotide excision repair, homologous recombination and non-homologous end joining are hypersensitive to the cytotoxic activity of phenylglyoxal

To study the type of DNA damage induced by phenylglyoxal, the parental Chinese hamster ovary cell line AA8 and several DNA repair-deficient Chinese

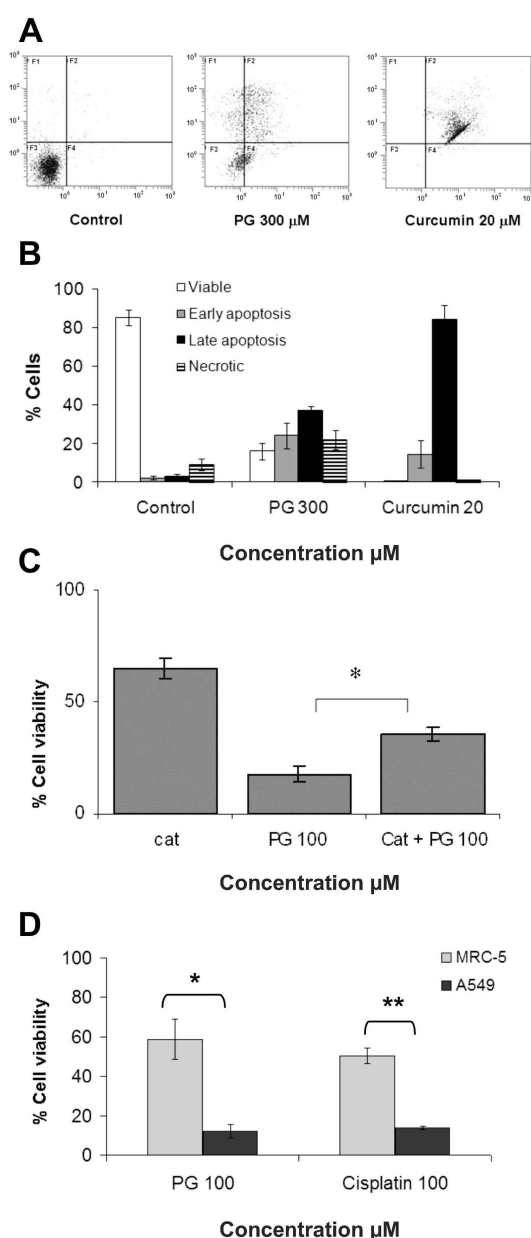


hamster ovary cell lines, including EM9 (BER), UV4 (NER), UV5 (global genomic NER), UV61 (transcription coupled NER), and V3-3 (NHEJ) were used. The HR-deficient VC8 cell line (V79 Chinese hamster lung cells mutated in BRCA2) and the VC8B2 cell line (VC8 cells complemented with human BRCA2) were also used. All cell lines were treated with five concentrations of phenylglyoxal (10–1,000  $\mu$ M) for 48 h and cell viability was estimated with the MTT assay. Figure 5A shows that viability of cells defective in BER (EM9) is similar to that of cells without defects in

this DNA repair mechanism (AA8), indicating that BER is not involved in the repair of phenylglyoxal-induced DNA damage. Cells defective in NER, HR and NHEJ, however, were more sensitive to phenylglyoxal than parental cells. Clonogenic experiments confirmed that cells deficient in HR were hypersensitive to the cytotoxic effects of phenylglyoxal (Fig. 5E). These results indicate that phenylglyoxal may induce bulky distortions in the DNA double helix (which are repaired by the NER pathway) and DNA double-strand breaks (which are repaired by HR and NHEJ).



**Fig. 5.** Role of base excision repair (BER), nucleotide excision repair (NER), non-homologous end joining (NHEJ), and homologous recombination (HR) in the repair of DNA damage induced by phenylglyoxal. In (A–D), cell viability was estimated with the MTT assay. In (E) cell survival was assessed with the clonogenic assay.



**Fig. 6.** Cancer cell death by phenylglyoxal. In (A) and (B) K562 cells were treated for 24 h with phenylglyoxal (PG) or the positive control curcumin, and the percentage of apoptotic cells was assessed with the Annexin V-FITC assay. Figure (C) shows that catalase (cat) prevents to some extent PG-induced cell growth inhibition in K562 leukemia cells (XTT assay); K562 cells were exposed to PG for 5 days and catalase (cat, 1,000 U/ml) was added 0.5 h before PG. (D) A549 human lung cancer cells are more sensitive than MRC5 human non-malignant lung fibroblasts to PG and to the anticancer drug cisplatin (MTT assay, 48 h exposure)

### Cancer cell death by phenylglyoxal

As mentioned previously, phenylglyoxal was cytotoxic in K562 leukemia cells (XTT assay). Flow cytometry experiments using the Annexin V-FITC assay

were carried out to evaluate the type of cell death induced by phenylglyoxal. Figure 6A and 6B show that a high percentage of cells exposed for 24 h to phenylglyoxal undergoes apoptosis, whereas approximately 20% of the cells treated with phenylglyoxal die through necrosis.

Evidence suggests that hydrogen peroxide may participate in phenylglyoxal-induced cell death. Phenylglyoxal and other dicarbonyl compounds have been found to directly inactivate glutathione peroxidase resulting in an increase in intracellular hydrogen peroxide production [20]. In addition, our results show that hydrogen peroxide mediates phenylglyoxal-induced topoisomerase I- and II-DNA complexes in K562 leukemia cells (Fig. 4). To test whether hydrogen peroxide participates in phenylglyoxal-induced cell death, K562 cells were exposed to phenylglyoxal in the presence or absence of catalase. Figure 6C shows that catalase pretreatment prevents to some extent the cytotoxic activity of phenylglyoxal, indicating that hydrogen peroxide plays a role in phenylglyoxal-induced cell death.

Using human K562 leukemia cells and non-malignant AA8 Chinese hamster cells, we observed that phenylglyoxal was more cytotoxic in leukemia cells than in the normal cells. To examine the possible selectivity of phenylglyoxal for cancer cells, we evaluated its cytotoxic activity on A549 human lung cancer cells and MRC5 human non-malignant lung fibroblasts using the MTT assay under the same experimental conditions. Our results, shown in Figure 6D, indicate that the viability of cancer cells treated with phenylglyoxal was lower than that of normal cells. We found similar results with cisplatin (Fig. 6D), a DNA damaging agent widely used in the treatment of patients with lung cancer.

## Discussion

Some of the most widely used anticancer drugs act by inducing DNA damage. Because phenylglyoxal is known to react with guanidine groups such as that of the DNA base guanine (Fig. 1), we hypothesized that this compound could induce DNA damage. We employed two standard methods commonly used for DNA damage detection (the comet assay and the  $\gamma$ -H2AX focus assay) and observed that phenyl-

glyoxal induces DNA damage (Fig. 2 and 3). Such DNA damage was observed after a 2 h-exposure to phenylglyoxal, and at a concentration similar to that required to reduce cell viability by 50% (30  $\mu$ M). Catalase pretreatment did not reduce the levels of DNA damage induced by PG in AA8 cells (2 h, 30  $\mu$ M,  $\gamma$ -H2AX focus assay, results not shown), therefore, suggesting that this effect is not mediated by the production of hydrogen peroxide.

DNA topoisomerase poisons comprise a group of clinically useful anticancer drugs that kill tumor cells by inducing topoisomerase-mediated DNA damage. These drugs stabilize the normally transient topo-DNA complexes formed during the catalytic cycle of the enzyme, leading to the formation of permanent DNA strand breaks that trigger cell death [18, 19, 22, 31]. Since evidence suggested that phenylglyoxal might induce topoisomerase-mediated DNA damage (see introduction section), we next investigated the ability of phenylglyoxal to induce topo-DNA complexes in individual cells with the TARDIS assay. By using specific antibodies, we detected high levels of topo I- and topo II-DNA complexes in K562 cells exposed to phenylglyoxal for 24 h. Such levels were similar to those induced by the topo II poison etoposide and much higher than for the topo I positive control camptothecin (Fig. 4). Because phenylglyoxal can generate hydrogen peroxide [20], which can induce topo-DNA complexes in cells [12], we evaluated if catalase pretreatment could reduce the levels of topo-DNA complexes induced by phenylglyoxal. Figure 4 shows that catalase pretreatment abolished the formation of topo I- and topo II-DNA complexes induced by phenylglyoxal, indicating that hydrogen peroxide mediates the formation of these complexes. Recent evidence supports a role for topo I and topo II in DNA fragmentation during the execution phase of apoptosis [13, 26, 27]. Because phenylglyoxal did not induce significant levels of topo-DNA complexes at short exposure times, we considered the possibility that the high levels of topo-DNA complexes observed in cells after a 24 h-exposure could be apoptotic topo-DNA complexes. Flow cytometry experiments using the Annexin V-FITC assay revealed a relatively high percentage of cells in late apoptosis after a 24 h-treatment with phenylglyoxal (Fig. 6D). Taking as a whole, our results indicate that DNA topoisomerases do not play a major role in phenylglyoxal-induced DNA damage (which is observed at short exposure times), and that the high levels of topo I- and topo II-DNA complexes

observed in cells treated with phenylglyoxal may be apoptotic topo-DNA complexes.

Cell lines deficient in several DNA repair pathways were used to test if DNA damage participates in the cytotoxic activity of phenylglyoxal and to better understand the type of DNA damage induced by this agent (Fig. 5). Because phenylglyoxal is known to react with the guanidine group of the DNA base guanine, we considered that phenylglyoxal-induced DNA damage could be repaired by the base excision repair (BER) pathway, which can repair damaged DNA bases. We used parental AA8 cells and BER-deficient EM9 cells and found, however, that both cell lines were equally sensitive to phenylglyoxal (MTT assays, Fig. 5A). Then, we considered that phenylglyoxal could induce bulky adducts in the DNA, which are repaired by the NER pathway. NER can be divided into two subpathways (global genomic NER and transcription coupled NER) that differ in their recognition of helix-distorting DNA damage. We observed that the NER-deficient cell lines UV4, UV5 (global genomic NER) and UV61 (transcription coupled NER) were more sensitive than their parental cell line (AA8) to the cytotoxic activity of phenylglyoxal (Fig. 5B), therefore indicating that phenylglyoxal may induce bulky distortions in the DNA.

Figure 3 shows that phenylglyoxal induces the formation of foci in the  $\gamma$ -H2AX focus assay. This assay is based on the ability of double-strand breaks (DSBs) to trigger phosphorylation of histone H2AX on Ser-139, which leads to the formation of nuclear foci. Since DSBs can be repaired by HR and by NHEJ, we used cells with deficiencies in these two pathways to assess their importance in the repair of phenylglyoxal-induced DNA damage. NHEJ-deficient V3-3 cells were more sensitive to phenylglyoxal than AA8 parental cells (Fig. 5C). The HR-deficient VC8 cell line was also more sensitive to phenylglyoxal than the VC8-B2 (functioning HR) cell line (Fig. 5D). Despite being statistically significant, the differences between these two cell lines were small. Clonogenic experiments confirmed that HR-deficient cells were more sensitive than VC8-B2 cells to the cytotoxic activity of phenylglyoxal (Fig. 5E). These results indicate that the formation of DSBs plays an important role in the cytotoxic activity of phenylglyoxal and that these DNA breaks are repaired by both HR and NHEJ.

Tumor cells often have defects in their DNA damage response. As mentioned before, the inability of cancer cells to properly repair some types of DNA

damage may explain why some tumor cells are often more vulnerable than normal proliferating cells to the effects of some DNA-damaging drugs used in cancer chemotherapy. Tumor cells are also known to produce high amounts of hydrogen peroxide [28], which makes them vulnerable to agents that further increase hydrogen peroxide levels [10–12]. Indeed, the use of hydrogen peroxide-generating systems is emerging as an attractive anticancer approach [10, 11, 23]. Because phenylglyoxal could both induce DNA damage and generate hydrogen peroxide, we evaluated if phenylglyoxal could induce selective killing of cancer cells. We exposed A549 human lung cancer cells and MRC5 human non-malignant lung fibroblasts to phenylglyoxal under the same experimental conditions and observed that the viability of the cancer cells was lower than that of the normal cells. The results were similar to those obtained with the alkylating agent cisplatin, which is used in the treatment of a variety of cancer types including lung cancer (Fig. 6D). Several compounds were screened against these two cell lines and showed no selective cytotoxicity [12].

In conclusion, this work reports for the first time that the guanidine-reactive agent phenylglyoxal has anticancer activity *in vitro* and that this activity is mediated, at least in part, by the induction of DNA damage and the generation of hydrogen peroxide. This work also evidences the production of different types of DNA damage by phenylglyoxal, which could be taken into consideration for killing cancer cells with deficiency in DNA repair mechanisms responsible for the removal of those types of DNA lesions. Future animal studies are needed to evaluate the anticancer potential of phenylglyoxal *in vivo*.

#### Acknowledgment:

This work was partially supported by a Marie Curie Individual Fellowship [MCFI-2002-01661]; Leukaemia and Lymphoma Research (formerly the Leukaemia Research Fund); the University of Seville; and Newcastle University.

#### References:

1. Binaschi M, Zagotto G, Palumbo M, Zunino F, Farinosi R, Capranico G: Irreversible and reversible topoisomerase II DNA cleavage stimulated by clerocidin: sequence specificity and structural drug determinants. *Cancer Res*, 1997, 57, 1710–1716.
2. Bryant HE, Ying S, Helleday T: Homologous recombination is involved in repair of chromium-induced DNA damage in mammalian cells. *Mutat Res*, 2006, 599, 116–123.
3. Cowell IG, Tilby MJ, Austin CA: An overview of the visualisation and quantitation of low and high MW DNA adducts using the trapped in agarose DNA immunostaining (TARDIS) assay. *Mutagenesis*, 2011, 26, 253–260.
4. Daroui P, Desai SD, Li TK, Liu AA, Liu LF: Hydrogen peroxide induces topoisomerase I-mediated DNA damage and cell death. *J Biol Chem*, 2004, 279, 14587–14594.
5. Gatto B, Richter S, Moro S, Capranico G, Palumbo M: The topoisomerase II poison clerocidin alkylates non-paired guanines of DNA: implications for irreversible stimulation of DNA cleavage. *Nucleic Acids Res*, 2001, 29, 4224–4230.
6. Helleday T, Petermann E, Lundin C, Hodgson B, Sharma RA: DNA repair pathways as targets for cancer therapy. *Nat Rev Cancer*, 2008, 8, 193–204.
7. Kai M, Ohkura Y, Yonekura S, Iwasaki M: Chemiluminescence determination of guanine and its nucleosides and nucleotides using phenylglyoxal. *Anal Chim Acta*, 1994, 287, 75–81.
8. Li TK, Chen AY, Yu C, Mao Y, Wang H, Liu LF: Activation of topoisomerase II-mediated excision of chromosomal DNA loops during oxidative stress. *Genes Dev*, 1999, 13, 1553–1560.
9. Lobrich M, Shibata A, Beucher A, Fisher A, Ensminger M, Goodarzi AA, Barton O, Jeggo PA: gammaH2AX foci analysis for monitoring DNA double-strand break repair: strengths, limitations and optimization. *Cell Cycle*, 2010, 9, 662–669.
10. Lopez-Lazaro M: A new view of carcinogenesis and an alternative approach to cancer therapy. *Mol Med*, 2010, 16, 144–153.
11. Lopez-Lazaro M: Dual role of hydrogen peroxide in cancer: Possible relevance to cancer chemoprevention and therapy. *Cancer Lett*, 2007, 252, 1–8.
12. Lopez-Lazaro M, Calderon-Montano JM, Burgos-Moron E, Austin CA: Green tea constituents (–)-epigallocatechin-3-gallate (EGCG) and gallic acid induce topoisomerase I- and topoisomerase II-DNA complexes in cells mediated by pyrogallol-induced hydrogen peroxide. *Mutagenesis*, 2011, 26, 489–498.
13. Lopez-Lazaro M, Willmore E, Elliott SL, Austin CA: Selenite induces topoisomerase I and II-DNA complexes in K562 leukemia cells. *Int J Cancer*, 2008, 123, 2217–2221.
14. Lopez-Lazaro M, Willmore E, Jobson A, Gilroy KL, Curtis H, Padget K, Austin CA: Curcumin induces high levels of topoisomerase I- and II-DNA complexes in K562 leukemia cells. *J Nat Prod*, 2007, 70, 1884–1888.
15. Luo J, Solimini NL, Elledge SJ: Principles of cancer therapy: oncogene and non-oncogene addiction. *Cell*, 2009, 136, 823–837.
16. Meschini R, Marotta E, Berni A, Filippi S, Fiore M, Mancinelli P, Natarajan AT, Palitti F: DNA repair deficiency and BPDE-induced chromosomal alterations in CHO cells. *Mutat Res*, 2008, 637, 93–100.



17. Mistry AR, Felix CA, Whitmarsh RJ, Mason A, Reiter A, Cassinat B, Parry A et al.: DNA topoisomerase II in therapy-related acute promyelocytic leukemia. *N Engl J Med*, 2005, 352, 1529–1538.
18. Nitiss JL: DNA topoisomerase II and its growing repertoire of biological functions. *Nat Rev Cancer*, 2009, 9, 327–337.
19. Nitiss JL: Targeting DNA topoisomerase II in cancer chemotherapy. *Nat Rev Cancer*, 2009, 9, 338–350.
20. Park YS, Koh YH, Takahashi M, Miyamoto Y, Suzuki K, Dohmae N, Takio K et al.: Identification of the binding site of methylglyoxal on glutathione peroxidase: methylglyoxal inhibits glutathione peroxidase activity via binding to glutathione binding sites Arg 184 and 185. *Free Radic Res*, 2003, 37, 205–211.
21. Pastor N, Lopez-Lazaro M, Tella JL, Baos R, Hiraldo F, Cortes F: Assessment of genotoxic damage by the comet assay in white storks (*Ciconia ciconia*) after the Doñana Ecological Disaster. *Mutagenesis*, 2001, 16, 219–223.
22. Pommier Y: Topoisomerase I inhibitors: camptothecins and beyond. *Nat Rev Cancer*, 2006, 6, 789–802.
23. Schumacker PT: Reactive oxygen species in cancer cells: live by the sword, die by the sword. *Cancer Cell*, 2006, 10, 175–176.
24. Shapiro R, Hachmann J: The reaction of guanine derivatives with 1,2-dicarbonyl compounds. *Biochemistry*, 1966, 5, 2799–2807.
25. Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL: A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res*, 1988, 175, 184–191.
26. Sordet O, Goldman A, Pommier Y: Topoisomerase II and tubulin inhibitors both induce the formation of apoptotic topoisomerase I cleavage complexes. *Mol Cancer Ther*, 2006, 5, 3139–3144.
27. Sordet O, Khan QA, Kohn KW, Pommier Y: Apoptosis induced by topoisomerase inhibitors. *Curr Med Chem Anticancer Agents*, 2003, 3, 271–290.
28. Szatrowski TP, Nathan CF: Production of large amounts of hydrogen peroxide by human tumor cells. *Cancer Res*, 1991, 51, 794–798.
29. Takahashi K: The reaction of phenylglyoxal with arginine residues in proteins. *J Biol Chem*, 1968, 243, 6171–6179.
30. Vogelstein B, Kinzler KW: Cancer genes and the pathways they control. *Nat Med*, 2004, 10, 789–799.
31. Wang JC: Cellular roles of DNA topoisomerases: a molecular perspective. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2002, 3, 430–440.
32. Watters GP, Smart DJ, Harvey JS, Austin CA: H2AX phosphorylation as a genotoxicity endpoint. *Mutat Res*, 2009, 679, 50–58.
33. Willmore E, Frank AJ, Padget K, Tilby MJ, Austin CA: Etoposide targets topoisomerase II $\alpha$  and II $\beta$  in leukemic cells: isoform-specific cleavable complexes visualized and quantified in situ by a novel immunofluorescence technique. *Mol Pharmacol*, 1998, 54, 78–85.

**Received:** December 12, 2011; **in the revised form:** June 14, 2012;  
**accepted:** June 28, 2012.

## **6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 6.4. EXTRACTO ACUOSO DE TÉ VERDE Y SUS PRINCIPALES COMPONENTES.

El té verde, obtenido a partir de las hojas secas de *Camellia sinensis*, es una de las bebidas más populares a nivel mundial. Tanto el té verde como su principal componente, la epigalocatequina-3-galato (EGCG) han demostrado tener efecto anticanceroso en numerosos modelos *in vitro* e *in vivo* y se encuentran en ensayos clínicos para la prevención y el tratamiento de determinados tipos de cáncer<sup>93-96</sup>. La EGCG es un éster formado por la condensación de epigalocatequina con ácido gálico (AG). La epigalocatequina y el AG tienen en común la presencia de pirogalol (PG) en su estructura (Figura 41).

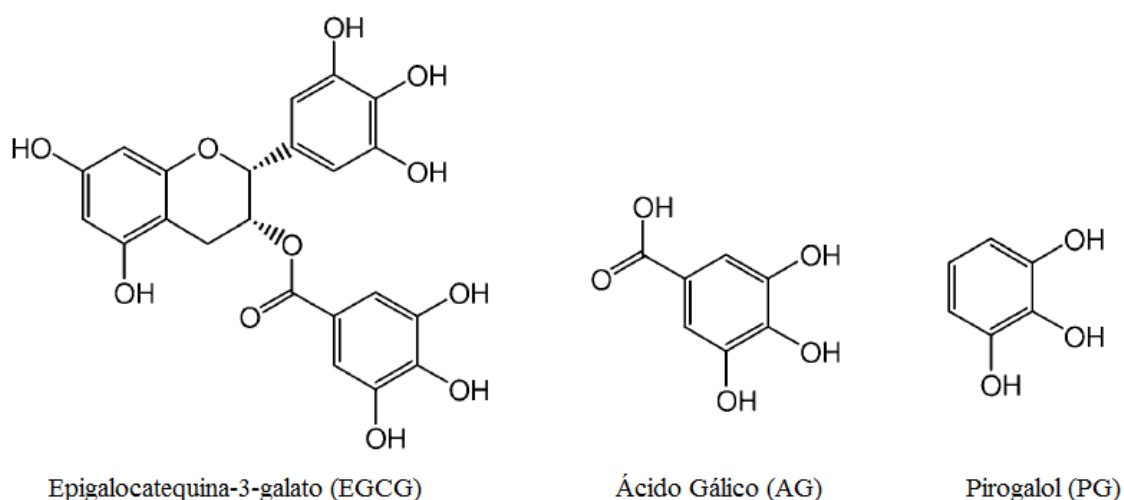


Figura 41. Estructura química de epigalocatequina-3-galato, ácido gálico y pirogalol.

En ensayos previos, tanto EGCG como AG han demostrado tener efectos citotóxicos por la formación de  $H_2O_2$  en células de leucemia K562, siendo su principal mecanismo citotóxico pero no el único<sup>53</sup>. Esta generación de  $H_2O_2$  es debida a la molécula de PG que contienen en su estructura tanto EGCG como AC, al ser capaz de autooxidarse<sup>97</sup> y que también ha demostrado actividad citotóxica<sup>53</sup>. Esta generación de  $H_2O_2$  demostrada por los componentes del té verde podría explicar la posible actividad anticancerosa del té verde<sup>95,96</sup>. Se sabe que las células cancerosas poseen mayores niveles basales de EROS que las células normales. Un aporte exógeno de EROS mediante un agente prooxidante, como el té verde o sus componentes, podría aumentar los niveles de EROS hasta niveles citotóxicos en las células cancerosas, sin que se llegasen a afectar las células normales. Durante esta tesis, se evaluó esta posible actividad anticancerosa selectiva del té verde y de sus principales componentes. Mediante el ensayo MTT se evaluó la viabilidad celular de células cancerosas de pulmón A549 y células normales de pulmón MRC-5 tras la exposición a un amplio rango de concentraciones de un extracto de té verde durante 48 h. También se evaluó la actividad citotóxica del ácido gálico y pirogalol, que son las dos moléculas responsables de la generación de  $H_2O_2$  por el principal componente del té

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

verde, la EGCG. Tanto el extracto acuoso de té verde, como el AG y el PG demostraron tener mayor actividad citotóxica frente a células cancerosas que frente a células normales (Figura 42), siendo sus valores de IC<sub>50</sub> en células cancerosas 2, 3 y 4 veces menores que en las células normales, respectivamente (Tabla 6).

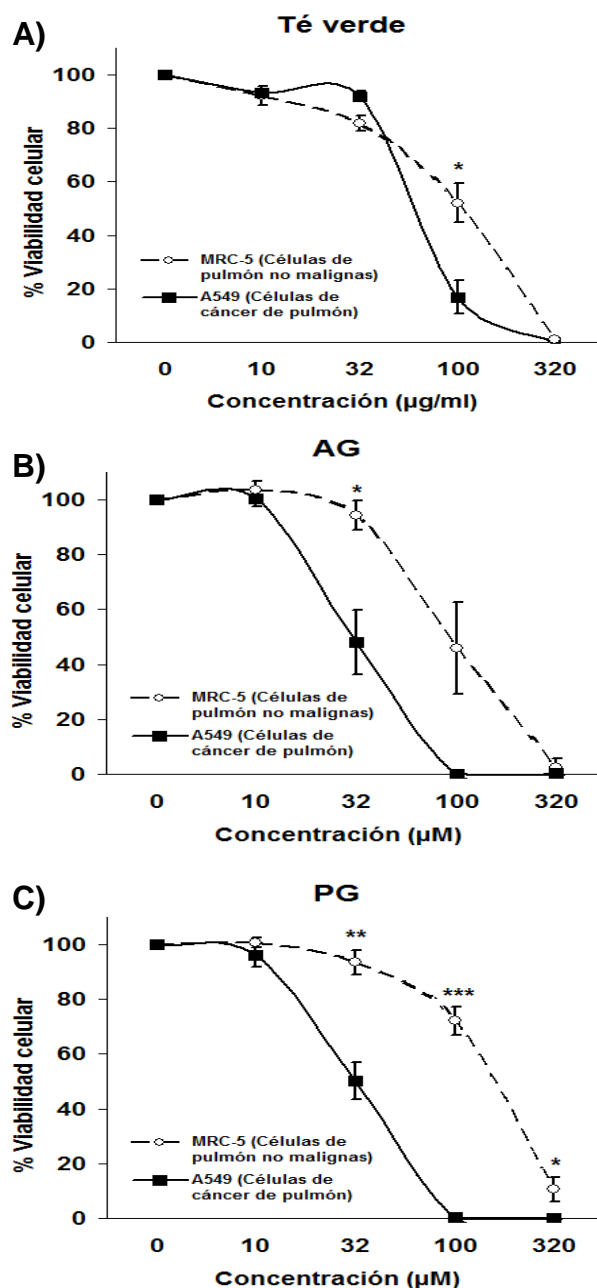


Figura 42. Evaluación de la citotoxicidad sobre células normales y cancerosas de pulmón de un extracto acuoso de té verde, ácido gálico (AG) y pirogalol (PG). Células no malignas de pulmón MRC-5 y células de adenocarcinoma de pulmón A549 fueron expuestas a té verde (A), AG (B) y PG (C) durante 48 h. Finalizado el tratamiento, se utilizó el ensayo MTT para la obtención de la viabilidad celular.

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Compuesto	IC50 (media $\pm$ SEM)		p
	MRC-5	A549	
Té verde	130,5 $\pm$ 44,6	61,6 $\pm$ 4,1	-
AG	103,4 $\pm$ 27,8	32,4 $\pm$ 5,6	-
PG	150,6 $\pm$ 8,4	32,7 $\pm$ 3,7	***

Tabla 6. Valores de IC50 (media  $\pm$  SEM) que presentaron un extracto acuoso de té verde, AG y PG en células MRC-5 y A549 tras una exposición de 48 h. Los valores están expresados en  $\mu\text{g/ml}$  para el caso del té verde y en  $\mu\text{M}$  para el caso de AG y PG.

Existen datos que sugieren que esta citotoxicidad selectiva sobre células cancerosas se debe a la generación de  $\text{H}_2\text{O}_2$  por estos compuestos<sup>53</sup>. Se sabe que entre los efectos citotóxicos generados por  $\text{H}_2\text{O}_2$ , se encuentra la generación de lesiones en el ADN. Tanto PG como AG generan daño en el ADN debido a la generación de estrés oxidativo<sup>98-100</sup>. Sin embargo, se desconoce las vías de reparación implicadas en la reparación del daño en el ADN generado por estos compuestos. Con el objetivo de conocer los mecanismos de reparación de las lesiones en el ADN inducidas por PG, se realizó un ensayo MTT con una serie de líneas celulares deficientes en alguna de las vías de reparación del daño en el ADN. Se comparó la viabilidad celular de las células deficientes frente a la viabilidad de sus correspondientes células parentales (no deficientes) tras la exposición a distintas concentraciones de PG durante 48 h (Figura 43 y Tabla 7). Células deficientes en FA y HR demostraron ser bastante más sensibles al efecto citotóxico de PG que las células no deficientes en estas vías, mientras que células deficientes en NHEJ demostraron ser ligeramente más sensibles al efecto citotóxico de PG. Células deficientes en BER mostraron la misma sensibilidad a PG que sus correspondientes células no deficientes. Se sabe que BER es una de las vías implicadas en la reparación del daño oxidativo en el ADN. Esta vía se encarga de reparar las bases oxidadas y las roturas de cadena simple del ADN generadas por  $\text{H}_2\text{O}_2$  a bajas concentraciones. Sin embargo, este tipo de lesiones no son las principales responsables de la muerte celular inducida por  $\text{H}_2\text{O}_2$ , sino que son las roturas de doble cadena que ésta genera a altas concentraciones las que inducen la muerte celular<sup>101-103</sup>. Las vías encargadas en la reparación de las roturas de doble cadena son la NHEJ y la HR. Esto podría explicar los resultados observados con PG. Las células deficientes en BER no mostraron mayor sensibilidad a PG posiblemente por tener funcionales la HR y la NHEJ. Por otra parte, se sabe que la NHEJ puede participar en la reparación del daño en el ADN en cualquiera de las fases del ciclo celular, pero principalmente en la fase G1; mientras que la HR está activa durante las fases S y G2. Las líneas celulares utilizadas en este experimento presentan un elevado ritmo

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

de división, por lo que la vía de reparación principal en funcionamiento es la HR. Todo esto podría explicar el por qué las células deficientes en NHEJ fueron menos sensibles a PG que las líneas deficientes en HR. La sensibilidad de células deficientes a FA podría deberse a la implicación de esta vía en la activación de la HR<sup>104</sup>. La importancia de la implicación de estas vías radica en la existencia de determinados tipos de cánceres que son deficientes en las vías de reparación del daño en el ADN. PG o compuestos que lo contengan en su estructura podrían ser más citotóxicos para cánceres deficientes en las vías involucradas en la reparación del daño generado por estos compuestos, especialmente en aquellos tipos de cánceres deficientes en HR.

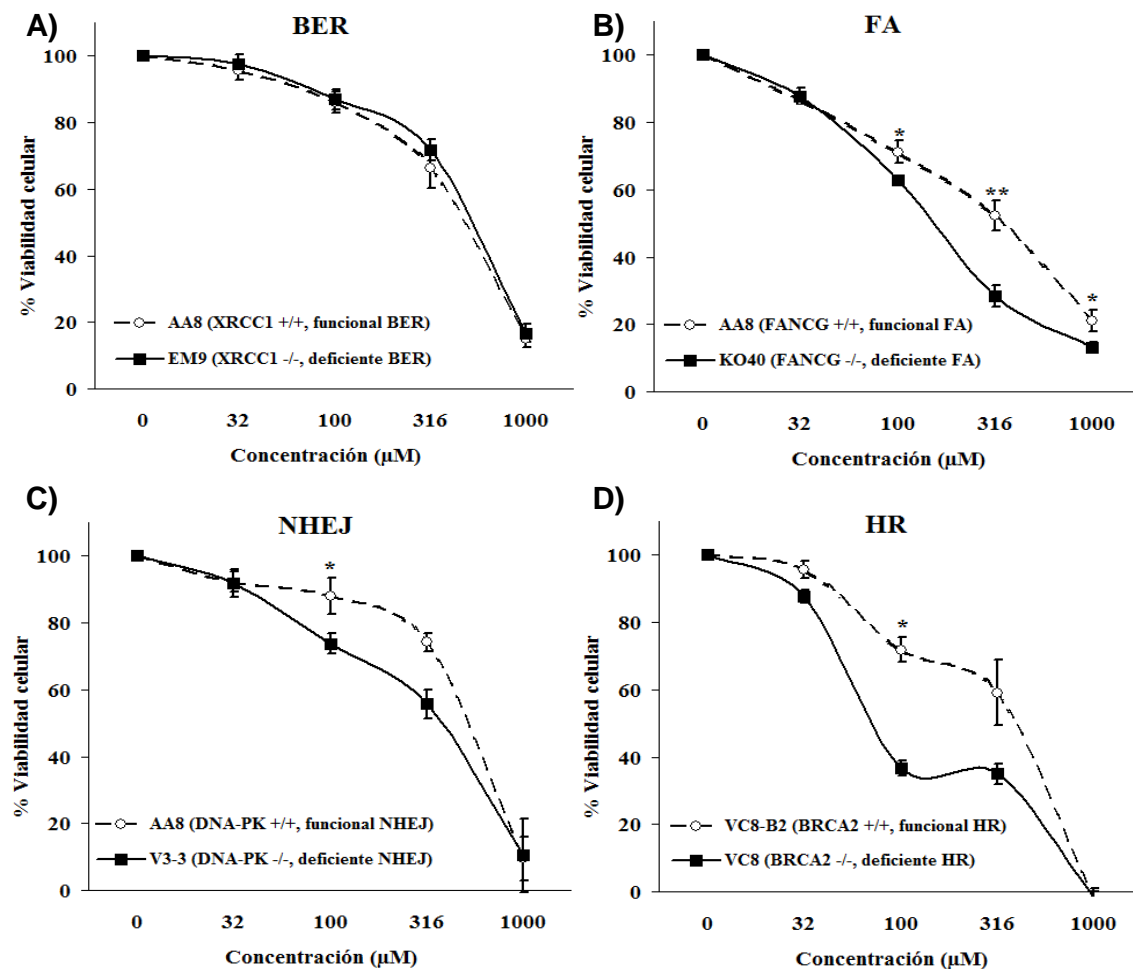


Figura 43. Evaluación de las vías implicadas en la reparación del daño en el ADN inducido por PG. Líneas deficientes en BER (A), FA (B), NHEJ (C) y HR (D) junto a sus respectivas líneas parentales fueron expuestas 48 h a distintas concentraciones de pirogalol. Finalizado el tratamiento, se realizó el ensayo MTT para poder obtener los valores de viabilidad celular.

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

VÍA	IC50 (media $\pm$ SEM; $\mu$ M)		P
	Célula funcional	Célula deficiente	
BER	450,9 $\pm$ 47,5	496,4 $\pm$ 12,3	-
FA	341,7 $\pm$ 49,0	156,4 $\pm$ 10,6	*
NHEJ	521,2 $\pm$ 45,2	318,8 $\pm$ 27,7	-
HR	301,7 $\pm$ 54,3	74,6 $\pm$ 2,6	-

Tabla 7. Valores de IC50 (media  $\pm$  SEM;  $\mu$ M) obtenidos en las diferentes líneas celulares tras un tratamiento de 48 h con pirogalol.

En resumen, té verde y sus principales compuestos tienen potencial anticanceroso selectivo *in vitro* frente células de cáncer de pulmón, dato que apoya los ensayos clínicos de cáncer de pulmón ya iniciados con estos compuestos.

Cabe destacar que parte de los datos comentados en este apartado se encuentran publicados en el artículo titulado *Green tea constituents (-)-epigallocatechin-3-gallate (EGCG) and gallic acid induce topoisomerase I- and topoisomerase II-DNA complexes in cells mediated by pyrogallol-induced hydrogen peroxide*, el cual se encuentra publicado en la revista *Mutagenesis* (2011).

### 6.5. ÁCIDO CLOROGÉNICO.

El café, obtenido de las semillas de varias especies del género *Coffea*, es una de las bebidas más consumidas en el mundo debido a sus propiedades estimulantes del sistema nervioso central. El café ha sido asociado a numerosos efectos beneficiosos para la salud debido a su contenido en compuestos antioxidantes, incluyendo la prevención de diabetes tipo 2, enfermedad del Parkinson y algunos tipos de cáncer<sup>105,106</sup>. Sin embargo, el café también se ha asociado con un incremento del estrés oxidativo, aumentando el riesgo de enfermedades crónicas como enfermedades cardiovasculares<sup>105,106</sup>. Este incremento del estrés oxidativo se debe a la capacidad de autooxidación de los componentes del café o a su oxidación durante el tostado de las semillas<sup>97,107-109</sup>. Hegele y cols.<sup>109</sup> demostraron que diferentes muestras de café tuvieron actividad citotóxica sobre células de endotelio de aorta, que fue principalmente debida a la generación de peróxido de hidrógeno por los componentes del café. Esta capacidad demostrada por el café para generar estrés oxidativo podría tener propiedades anticancerosas selectivas. Las células tumorales tienen niveles basales elevados de EROs<sup>33</sup>. Se piensa que un aporte exógeno controlado de EROs podría aumentar los niveles de EROs en las células cancerosas hasta niveles citotóxicos sin que se llegara a alcanzar niveles citotóxicos para células no malignas. En este aporte exógeno se basan los estudios sobre el posible uso de agentes



## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

prooxidantes en la terapia del cáncer y es una de las estrategias seguidas en esta tesis para la búsqueda de nuevos fármacos más selectivos para el tratamiento del cáncer de pulmón.

Para comprobar la posible actividad anticancerosa selectiva del café, células de cáncer de pulmón A549 y células normales de pulmón MRC-5 fueron expuestas a distintas concentraciones de café soluble comercial y café verde soluble comercial durante 48 horas. La viabilidad celular tras este tiempo de incubación fue medida mediante el ensayo MTT. Ambos tipos de café demostraron un ligero mayor efecto citotóxico sobre células cancerosas que sobre las células normales (Figura 44), con un valor de IC<sub>50</sub> dos veces menor para las células cancerosas en ambos tipos de café. Estos valores de IC<sub>50</sub> (media  $\pm$  SEM;  $\mu$ g/ml) fueron, respectivamente, para las células normales MRC-5 y las células cancerosas A549:  $469,9 \pm 82,7$  y  $211,8 \pm 33,6$  en el caso del café normal; y  $987,0 \pm 193,8$  y  $508,1 \pm 13,1$  en el caso del café verde.

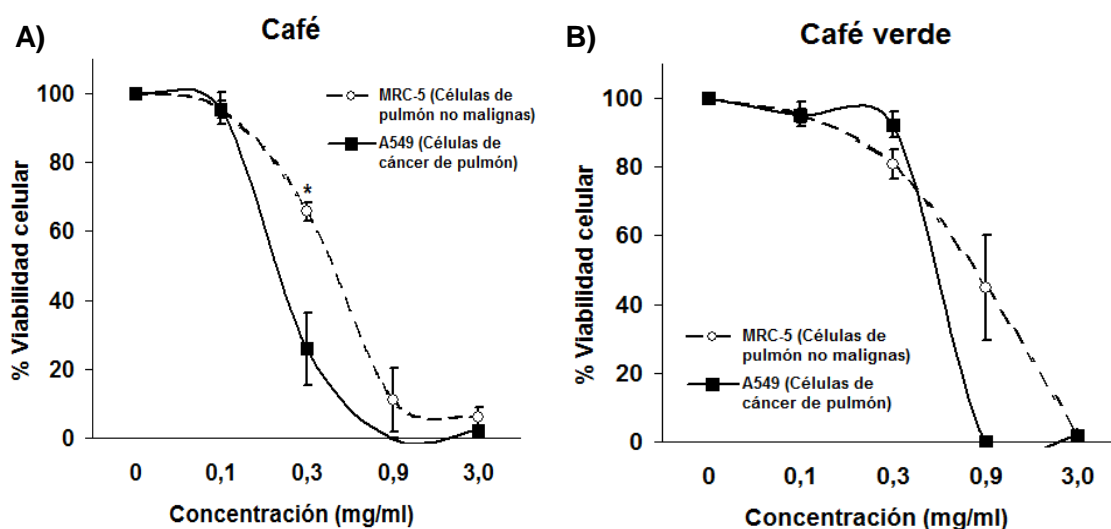


Figura 44. Evaluación de la citotoxicidad sobre células normales y cancerosas de pulmón de café y café verde solubles comerciales. Células no malignas de pulmón MRC-5 y células de adenocarcinoma de pulmón A549 fueron expuestas a café (A) y café verde (B) durante 48 h. Tras dicho tiempo, la viabilidad celular fue obtenida mediante el ensayo MTT.

Como se ha comentado anteriormente, esta selectividad frente a células cancerosas puede deberse a la generación de EROs por parte de los compuestos que componen el café y que son los responsables de su efecto citotóxico<sup>97,109</sup>. De entre los posibles compuestos responsables de este efecto citotóxico del café, uno de ellos puede ser el ácido clorogénico. El ácido clorogénico (ACG) es un éster formado por el ácido caféico y el ácido quínico (Figura 45). Aunque el ACG se encuentra distribuido en numerosos alimentos de origen vegetal, es el café la principal fuente

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

de este ácido en la dieta. Las propiedades antioxidantes del ACG son muy conocidas<sup>110</sup>. Sin embargo, se sabe que también puede actuar como prooxidante generando EROs, dependiendo de su concentración<sup>111</sup>. Esta capacidad de actuar como prooxidante puede otorgar un efecto citotóxico selectivo al ACG. Por este motivo, fue escogido para su estudio durante esta tesis.

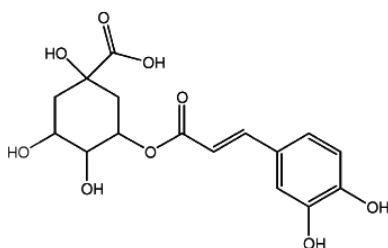


Figura 45. Estructura química del ácido clorogénico.

En primer lugar, para comprobar el posible efecto citotóxico de ACG, células de leucemia K562 fueron expuestas a distintas concentraciones de este compuesto y su viabilidad celular fue medida mediante la técnica XTT, demostrando que ACG ejerció efecto citotóxico en estas células. Dicho efecto fue casi totalmente eliminado cuando las células fueron tratadas al mismo tiempo con catalasa, demostrando que la generación de EROs, concretamente de peróxido de hidrógeno, es el principal mecanismo de citotoxicidad de ACG (Figura 46).

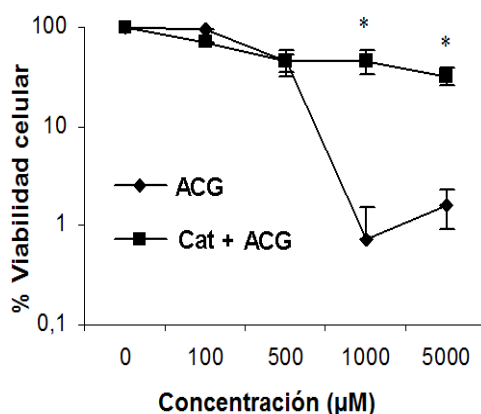


Figura 46. Papel de la generación de EROs en el mecanismo de citotoxicidad del ácido clorogénico. Células K562 fueron expuestas a ácido clorogénico durante 5 días en presencia o ausencia de catalasa (añadida una hora antes que el ácido clorogénico). La viabilidad celular fue medida mediante el ensayo XTT.

Teniendo en cuenta que el objetivo principal de esta tesis es la búsqueda de nuevos compuestos selectivos para el tratamiento del cáncer de pulmón, se decidió evaluar el posible

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

potencial anticanceroso selectivo del ACG en un ensayo *in vitro* de cáncer de pulmón. Células no malignas de pulmón MRC-5 y células cancerosas de pulmón A549 fueron expuestas a un rango de concentraciones de ACG durante 48 h. La viabilidad celular se evaluó mediante la técnica MTT. Los resultados obtenidos (Figura 47) demuestran que concentraciones específicas de ACG fueron más citotóxicas para células cancerosas, destacando la concentración de 1 mM que disminuyó la viabilidad celular de las células cancerosas hasta casi un 1%, sin que la viabilidad de las células no malignas se viese afectada. Los valores de IC<sub>50</sub> (medias  $\pm$  SEM; mM) fueron  $0.47 \pm 0.06$  para células cancerosas A549 y  $1.97 \pm 0.11$  para células normales MRC5.

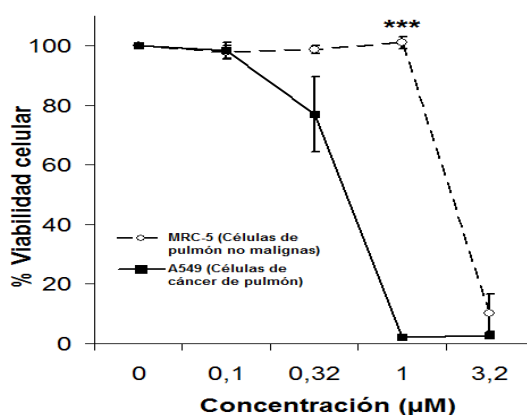


Figura 47. El ácido clorogénico mostró mayor actividad citotóxica sobre células de cáncer de pulmón que sobre células normales de pulmón. Las células fueron tratadas durante 48 h y la viabilidad celular fue medida mediante el ensayo MTT.

Esta selectividad mostrada por ACG podría deberse a la generación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, principal responsable de su efecto citotóxico. El aporte exógeno de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generado por ACG elevaría los niveles de EROs traspasando el umbral tolerado de las células cancerosas, desencadenando la muerte celular. Las células normales no se verían afectadas por este aporte exógeno de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, al tener niveles basales de EROs más bajos.

Se sabe que entre los efectos citotóxicos inducidos por las EROs se encuentra la generación de daño en el ADN<sup>112</sup>. Para evaluar si la generación de daño en el ADN también participaba en el mecanismo citotóxico de ACG, se realizó el ensayo cometa. Las células fueron expuestas a varias concentraciones de ACG (0,5, 1 y 5 mM) y a diferentes tiempos de exposición (2 y 24 h). Los resultados que se obtuvieron (Figura 48) demostraron que aproximadamente el 20% de las células tratadas con ACG presentaron daño en el ADN, a excepción de la concentración más elevada ensayada (5 mM) que mostró elevados niveles de daño en el ADN tras un tiempo de exposición de 24 h debido al elevado efecto citotóxico a esta concentración. Para confirmar el daño en el ADN inducido por ACG, se realizó el ensayo de inmunofluorescencia de focos  $\gamma$ H2AX (Figura 49). Con este ensayo se observó que células

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

tratadas durante 2 horas con 0,5 mM de ACG mostraron un incremento en la formación de focos  $\gamma$ H2AX, que es un indicativo de daño en el ADN, confirmándose que ACG es capaz de inducir daño en el ADN.

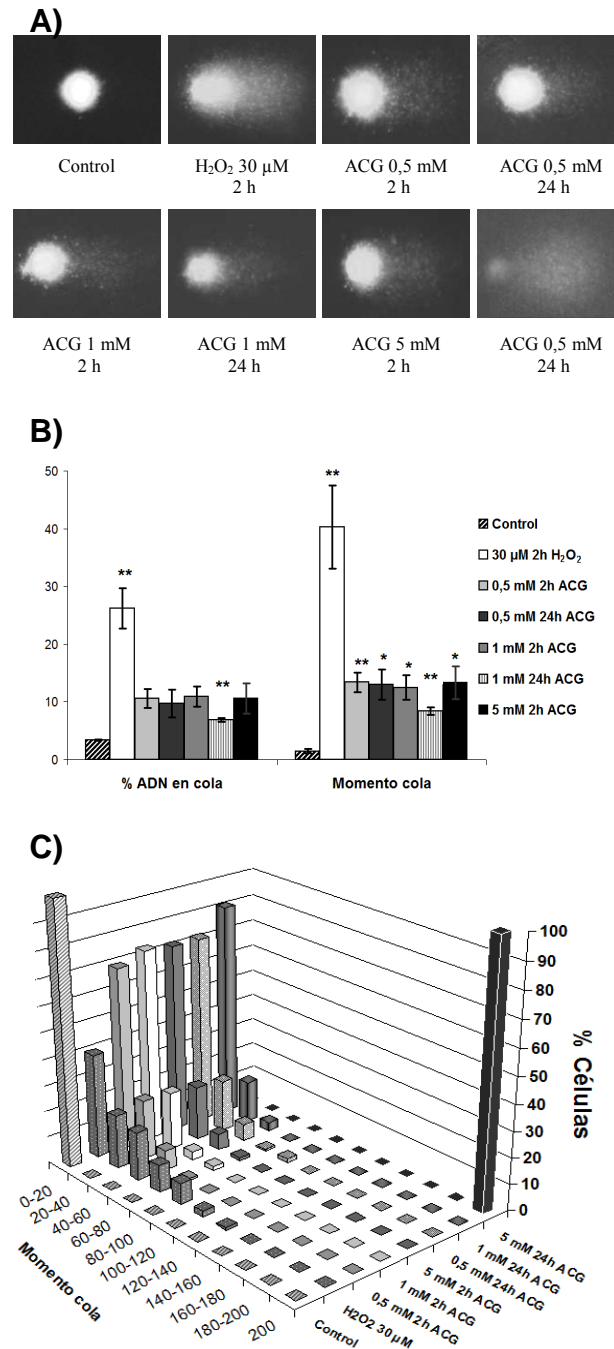


Figura 48. Evaluación del daño en el ADN inducido por el ácido clorogénico (ACG) en células K562. A) Fotografías representativas de células sin tratamiento, células tratadas con  $H_2O_2$  (control positivo), y células expuestas a diferentes concentraciones de ACG. B) Cuantificación del daño en el ADN expresado como el porcentaje del ADN en la cola y el parámetro momento cola. C) Representación del momento cola por intervalo de valores frente al porcentaje de células.

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

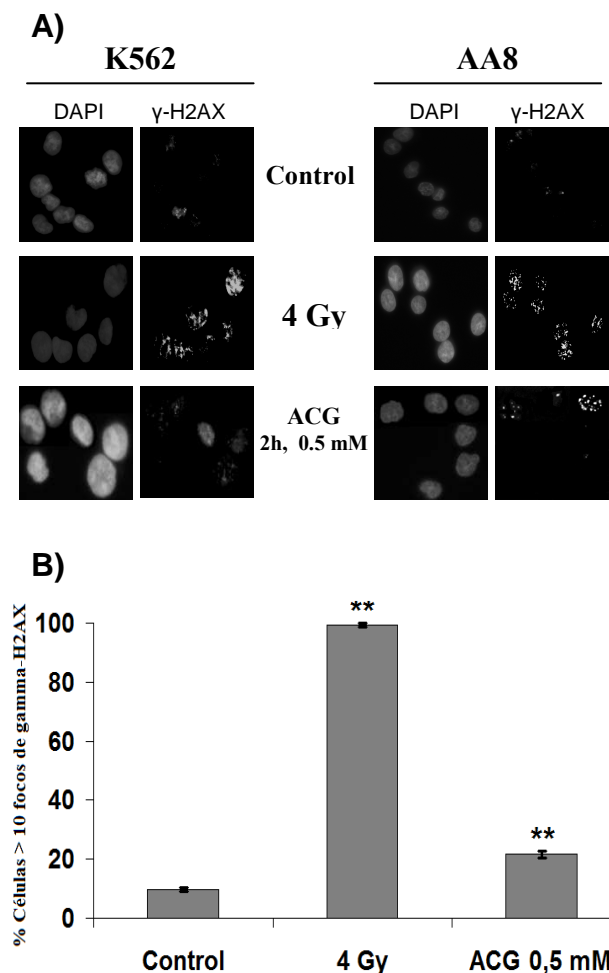


Figura 49. Evaluación del daño en el ADN inducido por el ácido clorogénico (ACG) en células K562 y células AA8 mediante la técnica de inmunofluorescencia de focos de  $\gamma$ H2AX. A) Fotografías representativas de células sin tratamiento, células irradiadas con rayos X (control positivo) y células expuestas a 0,5 mM de ACG durante 2 horas. B) Cuantificación del número de focos de  $\gamma$ H2AX que presentaron células AA8 sin tratamiento (control) y células expuestas a rayos X (4 Gy) o a ACG (0,5 mM).

Se sabe que el  $\text{H}_2\text{O}_2$ , es capaz de inducir daño en el ADN a través de la estabilización de los complejos de ADN-topoisomerasa que se forman durante los procesos biológicos de replicación, transcripción o recombinación<sup>112</sup>. Debido a que ACG genera  $\text{H}_2\text{O}_2$ , el siguiente paso fue la evaluación de la formación de complejos de rotura ADN-topo como posible mecanismo de la generación del daño inducido por ACG y la implicación de la generación de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Para ello se realizó el ensayo TARDIS (Figura 50) después de la exposición de las células a 1 y 5 mM de ACG durante 2 y 24 h. Solamente la exposición a 5 mM de ACG durante 24 h demostró inducir niveles elevados de complejos ADN-topo. Estos complejos no se pudieron

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

detectar con el pretratamiento con catalasa, indicando la participación de la generación de  $H_2O_2$  por ACG en la formación de estos complejos ADN-topo.

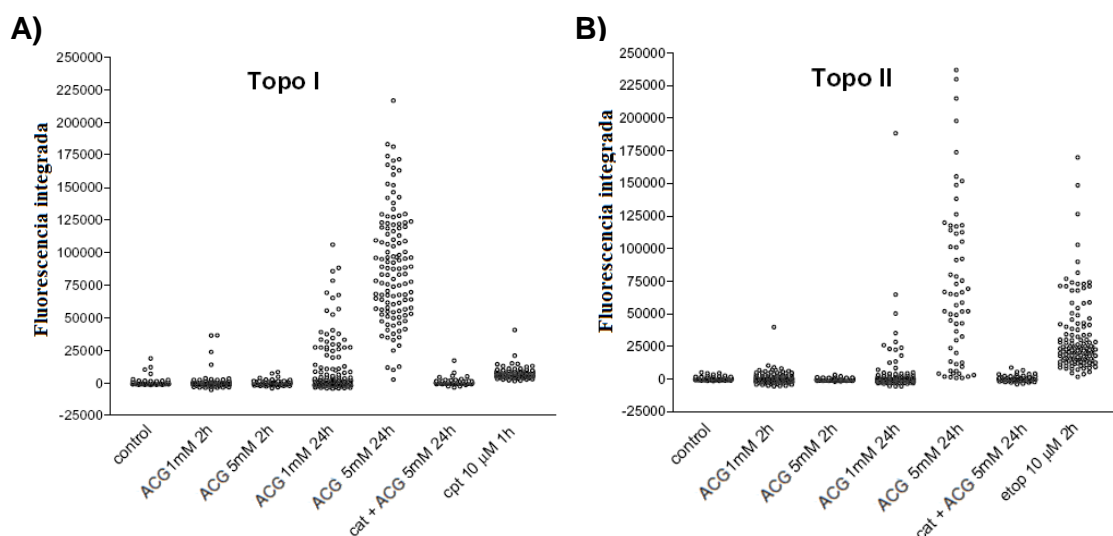


Figura 50. Ácido clorogénico induce complejos ADN-topoisomerasas en células K562 mediado por peróxido de hidrógeno (ensayo TARDIS). Los valores de fluorescencia integrada (unidades arbitrarias), indicando los niveles de complejos ADN-topoisomerasa I (A) y complejos ADN-topoisomerasa II (B), han sido cuantificados y presentados en células individuales. Catalasa fue añadida media hora antes que el ácido clorogénico. Como controles positivos fueron utilizados camptotecina (cpt) y etopósido (etop).

En los últimos años, se ha demostrado que las topoisomerasas juegan un papel importante en la fragmentación del ADN durante la ejecución de la apoptosis<sup>91,92</sup>. Para comprobar si los complejos ADN-topo observados a altas concentraciones de ACG y elevado tiempo de exposición se debían principalmente a la inducción de apoptosis por ACG, se realizó un ensayo de citometría de flujo con un kit de Annexina V-FITC. Este ensayo demostró que ACG indujo principalmente muerte celular por apoptosis a las mismas concentraciones y tiempo de exposición en las que se observaron los complejos ADN-topo (Figura 51). Estos resultados sugieren que la inducción de apoptosis es la principal responsable de la formación de elevados niveles de complejos ADN-topos tras tiempo de exposición prolongados a ACG.

La importancia del efecto anticanceroso selectivo observado por ACG queda reducida debido a que este efecto se ha conseguido a elevadas concentraciones, que normalmente no se consiguen alcanzar debido a la baja biodisponibilidad de ACG por vía oral. Este problema

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

podría intentar resolverse mediante su administración mediante una infusión intravenosa o con ayuda de las nuevas tecnologías galénicas.

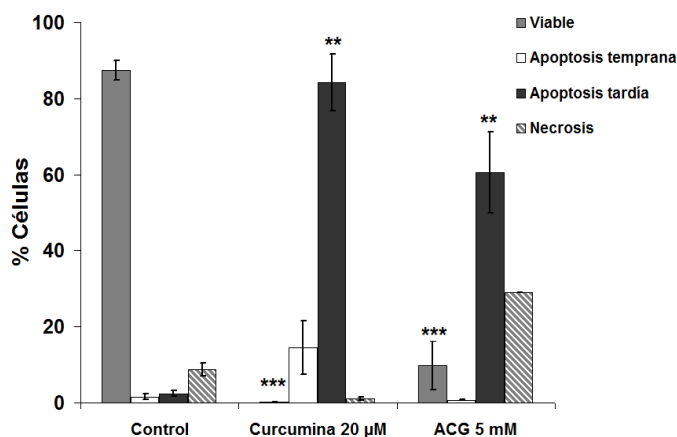


Figura 51. Inducción de muerte de células cancerosas por el ácido clorogénico. Células K562 fueron tratadas durante 24 h con ácido clorogénico o curcumina (control positivo). El porcentaje de células viables, células apoptóticas y células necróticas fue medido mediante citometría de flujo con el kit de Anexina V-FITC.

Resumiendo, ACG genera daño en el ADN y complejos ADN-topoisomerasas debido a su capacidad para generar peróxido de hidrógeno. Esta generación de  $H_2O_2$  es la principal responsable del efecto citotóxico de ACG, que en concentraciones específicas induce muerte selectiva de células de cáncer de pulmón, sin apenas afectar la viabilidad de células normales de pulmón. Sin embargo, es necesario resolver el problema de biodisponibilidad de ACG para que pueda ser utilizado como un nuevo fármaco anticanceroso.

Los resultados comentados anteriormente son fruto de la colaboración con la doctoranda Estefanía Burgos Morón. Estos resultados forman parte de la publicación titulada *The Coffee Constituent Chlorogenic Acid Induces Cellular DNA Damage and Formation of Topoisomerase I- and II-DNA Complexes in Cells*, que se encuentra publicada en la revista *Journal of Agricultural and Food Chemistry* (2012).

### 6.6. ALQUILÉTERES DE HIDROXITIROSILLO.

Estudios epidemiológicos han sugerido que la dieta Mediterránea puede reducir el riesgo de desarrollar determinadas patologías degenerativas, tales como enfermedades cardiovasculares y cáncer<sup>113-115</sup>. El aceite de oliva es la principal fuente de grasas en la dieta Mediterránea y ha sido asociado a numerosas propiedades beneficiosas para la salud, atribuidas a su alto contenido en ácidos grasos monoinsaturados y compuestos polifenólicos<sup>116-118</sup>. De entre



## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

los compuestos polifenólicos presentes en el aceite de oliva, destaca el 3,4-dihidroxifeniletanol (hidroxitirosol) por la gran variedad de actividades farmacológicas que posee<sup>119-121</sup>. Este compuesto también posee un posible potencial quimiopreventivo y quimioterapéutico contra el cáncer en estudios *in vitro* e *in vivo*<sup>122-126</sup>. Este efecto anticanceroso del hidroxitirosol (HTY) ha sido asociado con su capacidad de actuar como antioxidante o prooxidante dependiendo de su concentración<sup>119,124,127-129</sup>. Esta capacidad del HTY de actuar como un agente prooxidante fue el motivo de su estudio durante esta tesis, cuyo objetivo principal es la búsqueda de nuevos compuestos con mayor actividad anticancerosa selectiva para el tratamiento del cáncer de pulmón, siguiendo una serie de estrategias entre las que se encuentra el uso de agentes prooxidantes. Para comprobar esta posible actividad anticancerosa selectiva del HTY, se realizó el ensayo colorimétrico MTT sobre un modelo *in vitro* de cáncer de pulmón, utilizando células normales de pulmón MRC-5 y células cancerosas de pulmón A549. Junto al HTY, también se evaluó la actividad de una nueva serie de derivados alquiléteres de HTY que fueron sintetizados por el grupo del Dr. José Luis Espartero Sánchez<sup>46</sup>. La síntesis de estos nuevos derivados del HTY tuvo el objetivo de aumentar la lipofilia del HTY, para intentar aumentar su absorción y, por tanto, su actividad. Los resultados obtenidos junto con el posible mecanismo de acción de estos compuestos se encuentran recogidos en el artículo titulado *Selective cytotoxic activity of new lipophilic hydroxytyrosol alkyl ether derivatives*, el cual se encuentra publicado en la revista Journal of Agricultural and Food Chemistry (2013). Este artículo se comenta y adjunta a continuación.

Tanto HTY como sus nuevos derivados alquiléteres indujeron una mayor citotoxicidad sobre células cancerosas A549 que sobre células normales MRC-5, observándose una relación directa entre la naturaleza lipofílica de los compuestos y su actividad citotóxica; a mayor lipofilia, mayor fue la actividad citotóxica (Figura 2 artículo adjunto (Figura 52)). La selectividad mostrada por estos compuestos fue menor que la observada por el fármaco anticanceroso 5-fluorouracilo (5-FU). Sin embargo, cabe destacar que algunos de los nuevos derivados de HTY presentaron mayor potencia citotóxica sobre las células A549 que 5-FU. Aunque 5-FU disminuye la viabilidad celular de las células A549 de forma muy rápida desde concentraciones muy pequeñas (en rango de  $\mu\text{M}$ ), es necesaria la utilización de elevadas concentraciones para poder disminuir de forma drástica la viabilidad celular de las células cancerosas. Concretamente, 5-FU necesitó una concentración de 1 mM para poder alcanzar una viabilidad celular en A549 del ~30%; mientras que esta misma viabilidad fue conseguida con algunos de los derivados del HTY, como el derivado dodeciléter (HTDE), a concentraciones casi 30 veces más pequeñas, que en el caso de HTDE fue de 32  $\mu\text{M}$ , con el mismo efecto citotóxico sobre la viabilidad celular de las células normales MRC-5 (~80%) que el 5-FU.

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De todos los derivados de HTY, fue el HTDE el que presentó mayor actividad citotóxica selectiva. Por este motivo, se escogió este compuesto para el estudio de los posibles mecanismos implicados en la actividad citotóxica selectiva de estos compuestos.

Como se ha comentado anteriormente HTY actúa como agente prooxidante, generando estrés oxidativo como uno de los mecanismos responsables de su efecto citotóxico<sup>124,127</sup>. Para evaluar si el HTDE seguía conservando esta propiedad prooxidante del HTY, células A549 fueron tratadas con HTDE en presencia o ausencia de MnTMPyP (mimético de la superóxido dismutasa). En la Figura 3C del artículo adjunto (Figura 53) se puede observar como MnTMPyP redujo la actividad citotóxica de HTDE, por tanto, sugiere que la formación de EROs juega un papel importante en la actividad citotóxica de este compuesto.

Anteriormente se comentó que las células cancerosas tienen elevados niveles basales de EROs. Para poder mantener estos niveles dentro de niveles no citotóxicos, las células cancerosas han desarrollado una serie de mecanismos entre los que se incluye una activación continuada de la glicólisis, la cual también es necesaria para poder aportar los elevados niveles de energía y macromoléculas requeridos para el ritmo de proliferación descontrolado que presentan las células cancerosas. Por este motivo, en los últimos años se ha empezado a evaluar la inhibición de la glicólisis como una nueva estrategia terapéutica contra el cáncer<sup>25,76</sup>. Para poder valorar si en la actividad anticancerosa selectiva de HTDE podría estar implicada una inhibición de la glicólisis, células A549 fueron tratadas con este compuesto durante 8 h, y posteriormente se midió la producción de lactato (producto final de la glicólisis) y el consumo de glucosa (producto de partida de la glicólisis). Aunque HTDE demostró una producción de lactato y un consumo de glucosa ligeramente menor que las células no tratadas (Figuras 3A y 3B del artículo adjunto (Figura 53)), esta ligera inhibición de la glicólisis no parece ser la responsable del efecto citotóxico selectivo demostrado por este compuesto.

Por otra parte, es conocido que el estrés oxidativo puede causar daño en el ADN. Teniendo en cuenta la capacidad de generar estrés oxidativo por HTDE y que la generación de daño en el ADN es el mecanismo principal de la mayoría de los fármacos anticancerosos actuales, se valoró la posible implicación de la generación de daño en el ADN en el efecto citotóxico de HTDE. Con este objetivo se realizó el ensayo cometa en células A549 que habían sido expuestas a distintas concentraciones de HTDE durante 4 y 24 h. HTDE indujo daño en el ADN (Figuras 3D y 3E del artículo adjunto (Figura 53)), aunque éste fue menor que el inducido por el control positivo camptotecina. Estos datos sugieren que la generación de daño en el ADN está implicada en el efecto citotóxico de HTDE.

El siguiente paso a seguir fue la evaluación del tipo de daño en el ADN por HTDE. Para ello se utilizó una serie de líneas deficientes en alguna de las vías de reparación del ADN.

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Todas las células fueron tratadas con un rango de concentraciones de HTDE durante 24 h, y posteriormente se permitió la recuperación durante 24 h. HTDE no demostró tener mayor citotoxicidad sobre células deficientes en HR, NHEJ, MMR y FA que sobre las respectivas células parentales. Sin embargo, células deficientes en BER fueron más sensibles a HTDE que las células no deficientes (Figura 3F del artículo adjunto (Figura 53)). Se sabe que la vía BER juega un papel importante en la reparación del daño oxidativo<sup>130</sup>. La sensibilidad de células deficientes en la vía BER a HTDE, junto con la capacidad de generar estrés oxidativo e inducir daño en el ADN sugieren que HTDE induce daño oxidativo, el cual puede participar en su efecto citotóxico.

En el tratamiento del cáncer es muy común la combinación de fármacos anticancerosos con el fin de obtener mayores efectos. En esta combinación, es importante que los fármacos utilizados no presenten un efecto antagonístico entre ellos. Con el fin de evaluar que HTDE no presentaba antagonismo con otros fármacos anticancerosos, se estudió el efecto combinatorio de HTDE con 5-FU en células cancerosas A549 y células normales MRC-5 (Figura 4 del artículo adjunto (Figura 54)). El efecto combinatorio fue evaluado a través de los valores de viabilidad celular obtenidos mediante el ensayo MTT y analizados mediante el software Compusyn. Este efecto fue medido como Índice de Combinación o CI. De los resultados obtenidos destaca que HTDE demostró un efecto sinérgico con 5-FU sobre células A549 y un efecto antagonístico sobre células MRC-5, es decir, la combinación de 5-FU y HTDE fue más citotóxica para células cancerosas y menos citotóxica para células normales que la mostrada por los compuestos por separado.

El siguiente paso fue el estudio de la posible actividad citotóxica selectiva de HTDE contra otros tipos de cáncer. Se escogió evaluar esta actividad en cáncer de mama al ser otro de los cánceres con mayor prevalencia a nivel mundial<sup>131</sup>. Para ello, células normales de mama MCF10 y células cancerosas de mama MCF7 fueron tratadas con HTDE durante 48 h. En la Figura 5 del artículo adjunto (Figura 55) puede observarse como HTDE presentó una mayor actividad citotóxica sobre células cancerosas que sobre células normales en todas las concentraciones ensayadas, destacando que esta selectividad no fue observada por el 5-FU (fármaco utilizado en el tratamiento del cáncer de mama).

Se desconoce si la administración oral de HTDE puede llegar a alcanzar las concentraciones en plasma y tejidos necesarios para obtener el efecto citotóxico selectivo sobre células cancerosas comentado anteriormente. Sin embargo, teniendo en cuenta que la actividad anticancerosa de HTY ya ha sido demostrada tras ser administrado intragástricamente en un ensayo *in vivo* en ratas<sup>123</sup>, que HTDE tiene mayor estabilidad digestiva *in vitro* que HTY<sup>132</sup> y que otras actividades biológicas de HTDE ya han sido observadas en ensayos *in vivo*<sup>133</sup>, cabría esperar que HTDE podría llegar a tener actividad anticancerosa *in vivo*. Sin embargo, es

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

necesaria la realización de estos ensayos *in vivo* para poder confirmar la utilidad de HTDE en el tratamiento del cáncer.

En conclusión, una serie de nuevos derivados de HTY han demostrado tener actividad anticancerosa selectiva sobre células cancerosas de pulmón *in vitro*. El compuesto con mayor selectividad, HTDE, también demostró ser selectivo sobre células de cáncer de mama. La generación de EROs y de daño en el ADN están involucradas en el mecanismo citotóxico de HTDE.

# Selective cytotoxic activity of new lipophilic hydroxytyrosol alkyl ether derivatives

José Manuel Calderón-Montaña<sup>†</sup>, Andrés Madrona<sup>‡</sup>, Estefanía Burgos-Morón<sup>†</sup>, Manuel Luis Orta<sup>§</sup>, Santiago Mateos<sup>§</sup>, José Luis Espartero<sup>‡</sup> and Miguel López-Lázaro<sup>†\*</sup>

<sup>†</sup>*Department of Pharmacology, Faculty of Pharmacy, University of Seville, Seville, Spain*

<sup>‡</sup>*Department of Organic and Pharmaceutical Chemistry, Faculty of Pharmacy, University of Seville, Spain*

<sup>§</sup>*Department of Cell Biology, Faculty of Biology, University of Seville, Spain*

\*Corresponding Author (Tel: + 34 954 55 63 48; Fax: + 34 954 55 60 74; E-mail: mlopezlazaro@us.es)

**Abstract**

19

20 Recent data suggest that hydroxytyrosol, a phenolic compound of virgin olive oils, has  
21 anticancer activity. This communication reports the synthesis of decyl and hexadecyl  
22 hydroxytyrosyl ethers, as well as the cytotoxic activity of hydroxytyrosol and a series of  
23 seven hydroxytyrosol alkyl ether derivatives against A549 lung cancer cells and MRC5 non-  
24 malignant lung fibroblasts. Hydroxytyrosyl dodecyl ether (HTDE) showed the highest  
25 selective cytotoxicity and possible mechanisms of action were investigated; results suggest  
26 that HTDE can moderately inhibit glycolysis, induce oxidative stress and cause DNA damage  
27 in A549 cells. The combination of HTDE with the anticancer drug 5-fluorouracil induced a  
28 synergistic cytotoxicity in A549 cancer cells but not in non-malignant MRC5 cells. HTDE  
29 also displayed selective cytotoxicity against MCF7 breast cancer cells *vs* MCF10 normal  
30 breast epithelial cells in the 1-30 micromolar range. These results suggest that the cytotoxicity  
31 of HTDE is more potent and selective than that of parent compound hydroxytyrosol.

32

33 **Keywords:** olive oil, lipophilic derivatives, phenolic compounds, cancer, anticancer,  
34 cytotoxic

35

## 36 INTRODUCTION

37 Epidemiological studies suggest that a Mediterranean diet may reduce the risk of  
38 developing degenerative pathologies such as cardiovascular diseases and cancer.<sup>1-4</sup> Since  
39 olive oil is the main source of fat in the Mediterranean diet, the number of reports describing  
40 the beneficial properties of olive oil has notably increased in recent years. This olive oil  
41 popularity has mainly been attributed to its high content on monounsaturated fatty acids and  
42 to its richness in phenolic compounds.<sup>3-9</sup>

43 The presence of phenolic compounds in olive oil has attracted much attention due to  
44 their known biological activities and health effects. Particular attention has been placed on 3,4  
45 dihydroxyphenylethanol (hydroxytyrosol), an *o*-diphenolic compound that is present in virgin  
46 olive oil as secoiridoid derivatives or acetate esters and has shown a variety of  
47 pharmacological activities.<sup>10-15</sup> Accumulating preclinical evidence suggests that  
48 hydroxytyrosol has cancer chemopreventive and chemotherapeutic potential. In vitro  
49 experiments have shown that hydroxytyrosol inhibits proliferation and induces apoptosis in a  
50 variety of cancer cell lines from different origin, including breast, colon and leukemia cell  
51 lines.<sup>16-20</sup> Several mechanisms of action have been shown to participate in its cytotoxic  
52 activity, such as cell cycle arrest, cytochrome c release, activation of caspase 3, c-jun or bcl-2,  
53 and inhibition of CDK6, HER2, fatty acid synthase, or PI3K/Akt/NF-kappa B pathway  
54 (reviewed in reference 11). Recent animal experiments have revealed that hydroxytyrosol can  
55 also inhibit cancer cell growth in vivo.<sup>21</sup>

56 Our previous work reported the syntheses of lipophilic hydroxytyrosol derivatives in  
57 the form of esters<sup>22</sup> and ethers<sup>23</sup>, and the evaluation of their antioxidant activity in relation to  
58 that of hydroxytyrosol.<sup>24-26</sup> These studies revealed that the introduction of an acyl or alkyl  
59 side chain in the hydroxytyrosol structure did not reduce, or even improved, the antioxidant



60 capacity of hydroxytyrosol. We have studied the absorption, metabolism and digestive  
61 stability of these compounds<sup>27-29</sup> and have also observed that some of these hydroxytyrosol  
62 derivatives exhibit antiplatelet, anti-inflammatory and neuroprotective effects.<sup>30,31</sup> In this  
63 article we report the synthesis of two new alkyl derivatives of hydroxytyrosol, as well as the  
64 evaluation of the cytotoxic activity on cancer and non-malignant cells of hydroxytyrosol and a  
65 series of its ether derivatives (ethyl, butyl, hexyl, octyl, decyl, dodecyl and hexadecyl ethers).  
66 Interestingly, hydroxytyrosol isolated from olive oil waste waters (OOWW) has been used for  
67 the preparation of these compounds to give an added value to this type of residue.

68

## 69 MATERIAL AND METHODS

70

### 71 Chemicals

72 Hydroxytyrosol was obtained from olive oil waste waters as described elsewhere.<sup>23</sup>  
73 Hydroxytyrosol alkyl ether derivatives were prepared from hydroxytyrosol as described  
74 below. Mn(III) tetrakis(1-methyl-4-pyridyl)porphyrin pentachloride (MnTMPyP) was  
75 purchased from Biomol International. All other compounds used in this work were obtained  
76 from Sigma. All compounds were dissolved in DMSO and added to the cells after appropriate  
77 dilutions in cell culture medium. Final DMSO concentrations were never higher than 0.3%.

78

### 79 Cell Lines

80 The human A549 lung cancer cell line, the human embryo lung fibroblastic MRC5 cell  
81 line and the human MCF7 breast adenocarcinoma cell line were maintained in DMEM

82 supplemented with 2 mM glutamine, 50 µg/mL penicillin, 50 µg/mL streptomycin and 10%  
83 fetal bovine serum. The human MCF10 breast epithelial cell line (kindly provided by Dr. D.  
84 Ruano and Dr. P. Daza) was maintained in a 1:1 mixture of Dulbecco's modified Eagle's  
85 medium and Ham's F12 medium supplemented with 20 ng/mL epidermal growth factor, 100  
86 ng/mL cholera toxin, 10 µg/mL insulin and 500 ng/mL of hydrocortisone (95%) and horse  
87 serum (5%). To study the possible DNA damage response induced by the tested compounds,  
88 the following parental and DNA repair-deficient cell lines were used: AA8: parental Chinese  
89 hamster ovary cells; V3-3: AA8 cells mutated in XRCC7 (DNA-PK), non-homologous end  
90 joining (NHEJ) deficient; KO40: AA8 cells mutated in FANCG, Fanconi anemia (FA)  
91 deficient; VC8: V79 Chinese hamster lung cells mutated in BRCA2, homologous  
92 recombination (HR) deficient; VC8B2: VC8 cells complemented with human BRCA2 (HR  
93 proficient); EM9-V: AA8 cells mutated in XRCC1 (DNA ligase III), base excision repair  
94 (BER) deficient; EM9-XH: EM9 cells complemented with XRCC1 (BER proficient), HCT-  
95 116: human colon cancer cells mutated in MLH1, mismatch repair (MMR) deficient; and  
96 HCT-116 + c3: HCT-116 cells complemented with chromosome 3 (with MLH1 gene; MMR  
97 proficient).<sup>32,33</sup> These DNA repair-deficient cell lines, kindly provided by Dr. Thomas  
98 Helleday, were cultured in DMEM. All cell lines were cultured at 37 °C in a humidified  
99 atmosphere containing 5% CO<sub>2</sub>. Cell culture reagents were obtained from Life Technologies.

100

#### 101 Preparation of ether derivatives of hydroxytyrosol

102 Hydroxytyrosyl alkyl ethers (**10–16**) were prepared from hydroxytyrosol (**1**) using a  
103 method previously described by us.<sup>23</sup> The following compounds have been synthesized for the  
104 first time:

105 *1,2-bis(benzyloxy)-4-(2'-decyloxyethyl)benzene (7)*: white solid (86% yield).  $^1\text{H}$ -NMR  
106 (500 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$  ppm 7.37 (m, 10H, 2xPh), 6.96 (d,  $J=2.0$  Hz, 1H,  $H_4$ ), 6.92 (d,  $J=8.2$   
107 Hz, 1H,  $H_7$ ), 6.71 (dd, 1H,  $H_8$ ), 5.07 (s, 2H,  $\text{CH}_2\text{Ph}$  in pos. 5), 5.06 (s, 2H,  $\text{CH}_2\text{Ph}$  in pos. 6),  
108 3.48 (t,  $J=6.9$  Hz, 2H,  $H_{11}$ ), 3.32 (t,  $J=6.5$  Hz, 2H,  $H_{1'}$ ), 2.68 (t, 2H,  $H_2$ ), 1.43 (m, 2H,  $H_{2'}$ ),  
109 1.23 (m, 14H,  $H_{3'}$ – $H_{9'}$ ), 0.83 (t, 3H,  $H_{10'}$ ).  $^{13}\text{C}$ -NMR (125 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$  ppm 148.2 ( $C_5$ ),  
110 146.6 ( $C_6$ ), 137.4 y 137.3 ( $C_{\text{ipso}}$ , Bn groups), 132.2 ( $C_3$ ), 128.2–127.4 ( $C_{3'}$ ,  $C_{4'}$  y  $C_{5'}$ , groups  
111 Bn), 121.2 ( $C_8$ ), 115.4 ( $C_4$ ), 114.6 ( $C_7$ ), 70.9 ( $C_1$ ), 70.2 ( $\text{CH}_2\text{Ph}$  in pos. 6), 70.1 ( $\text{CH}_2\text{Ph}$  in pos.  
112 5), 69.8 ( $C_{1'}$ ), 35.0 ( $C_2$ ), 29.1 ( $C_{2'}$ ), 29.0–28.6 ( $C_{4'}$ – $C_{7'}$ ), 25.6 ( $C_{3'}$ ), 31.2 ( $C_{8'}$ ), 22.0 ( $C_{9'}$ ), 13.8  
113 ( $C_{10'}$ ). Elem. Anal. Calcd. for  $\text{C}_{32}\text{H}_{42}\text{O}_3$ : C, 80.97; H, 8.92. Found: C, 88.85; H, 8.78.

114 *1,2-bis(benzyloxy)-4-(2'-hexadecyloxyethyl)benzene (9)*: white solid (86% yield).  $^1\text{H}$ -  
115 NMR (500 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$  ppm 7.37 (m, 10H, 2xPh), 6.96 (d,  $J=2.0$  Hz, 1H,  $H_4$ ), 6.93 (d,  
116  $J=8.2$  Hz, 1H,  $H_7$ ), 6.72 (dd, 1H,  $H_8$ ), 5.08 (s, 2H,  $\text{CH}_2\text{Ph}$  in pos. 5), 5.07 (s, 2H,  $\text{CH}_2\text{Ph}$  in  
117 pos. 6), 3.49 (t,  $J=7.0$  Hz, 2H,  $H_{11}$ ), 3.33 (t,  $J=6.5$  Hz, 2H,  $H_{1'}$ ), 2.69 (t, 2H,  $H_2$ ), 1.45 (m, 2H,  
118  $H_{2'}$ ), 1.23 (m, 10H,  $H_{3'}$ – $H_{15'}$ ), 0.84 (t, 3H,  $H_{16'}$ ).  $^{13}\text{C}$ -NMR (125 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$  ppm  
119 148.1 ( $C_5$ ), 146.6 ( $C_6$ ), 137.4 y 137.3 ( $C_{\text{ipso}}$ , Bn groups), 132.2 ( $C_3$ ), 128.2–127.4 ( $C_{3'}$ ,  $C_{4'}$  y  
120  $C_{5'}$ , Bn groups), 121.3 ( $C_8$ ), 115.5 ( $C_4$ ), 114.7 ( $C_7$ ), 70.9 ( $C_1$ ), 70.2 ( $\text{CH}_2\text{Ph}$  in pos. 6), 70.1  
121 ( $\text{CH}_2\text{Ph}$  in pos. 5), 69.8 ( $C_{1'}$ ), 35.0 ( $C_2$ ), 31.2 ( $C_{14'}$ ), 29.1 ( $C_{2'}$ ), 29.0–28.6 ( $C_{4'}$ – $C_{13'}$ ), 25.6  
122 ( $C_{3'}$ ), 22.0 ( $C_{15'}$ ), 13.8 ( $C_{16'}$ ). Elem. Anal. Calcd. for  $\text{C}_{38}\text{H}_{54}\text{O}_3$ : C, 81.67; H, 9.74. Found: C,  
123 81.27; H, 9.35.

124 *4-(2'-decyloxyethyl)benzene-1,2-diol (14)*: colourless oil (83% yield).  $^1\text{H}$ -NMR (500  
125 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$  ppm 8.63 (s, 1H, OH in pos. 6), 8.56 (s, 1H, OH in pos. 5), 6.59 (d,  $J=8.0$   
126 Hz, 1H,  $H_7$ ), 6.57 (d,  $J=2.1$  Hz, 1H,  $H_4$ ), 6.43 (dd, 1H,  $H_8$ ), 3.44 (t,  $J=7.2$  Hz, 2H,  $H_{11}$ ), 3.33 (t,  
127  $J=6.6$  Hz, 2H,  $H_{1'}$ ), 2.58 (t, 2H,  $H_2$ ), 1.41 (m, 2H,  $H_{2'}$ ), 1.24 (m, 10H,  $H_{3'}$ – $H_{9'}$ ), 0.84 (t, 3H,  
128  $H_{10'}$ ).  $^{13}\text{C}$ -NMR (125 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$  ppm 144.8 ( $C_5$ ), 143.3 ( $C_6$ ), 129.7 ( $C_3$ ), 119.3 ( $C_8$ ),  
129 116.1 ( $C_4$ ), 115.3 ( $C_7$ ), 71.4 ( $C_1$ ), 69.9 ( $C_{1'}$ ), 34.9 ( $C_2$ ), 29.1 ( $C_{2'}$ ), 29.0–28.6 ( $C_{4'}$ – $C_{7'}$ ), 25.6

(C<sub>3'</sub>), 31.2 (C<sub>8'</sub>), 22.0 (C<sub>9'</sub>), 13.8 (C<sub>10'</sub>). Elem. Anal. Calcd. for C<sub>18</sub>H<sub>30</sub>O<sub>3</sub>: C, 73.43; H, 10.27.  
Found: C, 73.41; H, 10.39.

*4-(2'-hexadecyloxyethyl)benzene-1,2-diol (16)*: white solid (83% yield). <sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ ppm 8.59 (s, 2H, *OH* in pos. 5 and 6), 6.60 (d, *J*=8.0 Hz, 1H, *H*<sub>7</sub>), 6.58 (d, *J*=2.1 Hz, 1H, *H*<sub>4</sub>), 6.43 (dd, 1H, *H*<sub>8</sub>), 3.44 (t, *J*=7.2 Hz, 2H, *H*<sub>I</sub>), 3.33 (t, *J*=6.6 Hz, 2H, *H*<sub>I'</sub>), 2.59 (t, 2H, *H*<sub>2</sub>), 1.45 (m, 2H, *H*<sub>2'</sub>), 1.23 (m, 10H, *H*<sub>3</sub>–*H*<sub>15</sub>), 0.85 (t, 3H, *H*<sub>16</sub>). <sup>13</sup>C-NMR (125 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ ppm 144.8 (C<sub>5</sub>), 143.3 (C<sub>6</sub>), 129.7 (C<sub>3</sub>), 119.3 (C<sub>8</sub>), 116.1 (C<sub>4</sub>), 115.3 (C<sub>7</sub>), 71.4 (C<sub>I</sub>), 69.9 (C<sub>I'</sub>), 35.0 (C<sub>2</sub>), 31.2 (C<sub>14'</sub>), 29.1 (C<sub>2'</sub>), 29.0–28.6 (C<sub>4</sub>–C<sub>13'</sub>), 25.6 (C<sub>3'</sub>), 22.0 (C<sub>15'</sub>), 13.8 (C<sub>16'</sub>). Elem. Anal. Calcd. for C<sub>24</sub>H<sub>42</sub>O<sub>3</sub>: C, 76.14; H, 11.18. Found: C, 76.41; H, 10.71.

#### Cell proliferation assay

The MTT assay is a colorimetric technique for the quantitative determination of cell viability. It is based on the capability of viable cells to transform the MTT salt (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) into a purple formazan dye. Exponentially growing cells were seeded into 96-well plates and drugs were added 24 h later. Cells were exposed to the drugs for 48 h (except in the experiments with the parental and DNA repair-deficient cell lines, in which cells were exposure for 24 h and were then allowed to grow for additional 24 h in drug-free medium to let them repair the possible DNA damage induced by the drugs). After these 48 h, medium was removed and 125 μL MTT (1 mg/mL in medium) was added to each well for 5 h. Then, 80 μL 20% SDS in 20 mM HCl was added to dissolve the insoluble purple formazan product, plates were incubated for 10 h at 37 °C, and optical densities were measured at 540 nm on a multiwell plate spectrophotometer reader. Cell viability was expressed as percentage in relation to controls. All data were averaged from

at least three independent experiments and were expressed as means  $\pm$  standard error of the means (SEM).

### **Inhibition of glycolysis**

Glycolysis inhibition was assessed by measuring concentrations of glucose (initial product of glycolysis) and lactate (final product of glycolysis) in control and treated cells. Briefly,  $10^6$  cells were exposed to the tested compounds for 8 h, and glucose and lactate concentrations were determined in cell supernatants by using the Accutrend<sup>®</sup> Plus analyzer together with Accutrend glucose strips and BM-Lactate Strips (Roche Diagnostics). After calibrating the instrument with glucose and lactate calibration strips, test strips were used to determine glucose and lactate levels via colorimetric-oxidase mediator reactions according to the manufacturer's instructions.<sup>34</sup> Results are expressed as percentage of lactate production and percentage of glucose consumption in relation to untreated cells, and are shown as the means  $\pm$  standard error of the means (SEM) of three independent experiments.

### **Comet assay**

The single-cell gel electrophoresis assay (comet assay) is a well established technique for DNA damage detection. The images obtained with this assay resemble a "comet" with a distinct head and tail; the head is composed of intact DNA, while the tail consists of damaged (single-strand or double-strand breaks) DNA. This assay has been described in detail by Singh et al.<sup>35</sup> We followed this protocol with minor modifications described previously.<sup>36</sup> Briefly, standard slides were immersed in 1% normal melting agarose at 55 °C, left to allow the agarose to solidify, and kept at 4 °C until use. After cell treatments, approximately 10000

cells were mixed with 85  $\mu$ L of low-melting agarose (LMA) at 37 °C. This mixture was rapidly pipetted onto the slides with the first agarose layer, spread using a coverslip, and kept at 4 °C for 8 min to allow the LMA to solidify. The coverslips were then removed, and a third layer of 100  $\mu$ L of LMA at 37 °C was added, covered with a coverslip, and allowed to solidify at 4 °C for 8 min. After removal of the coverslips, cells were incubated in the dark for 1 h at 4 °C in a lysis solution containing 10 mM Tris-HCl, 2.5 M NaCl, 100 mM Na<sub>2</sub>-EDTA, 0.25 M NaOH, 1% (v/v), Triton X-100, and 10% (v/v) DMSO, pH 12.0. To unwind the DNA, the slides were incubated for 20 min in an electrophoretic buffer containing 1 mM Na<sub>2</sub>-EDTA and 300 mM NaOH, pH 12.8. Electrophoresis was carried out at 1 V/cm for 20 min. After neutralization with 3  $\times$  5 min washes of 0.4 M Tris-HCl, pH 7.5, to remove alkali and detergent, cells were stained with the fluorochrome 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) in Vectashield (mounting medium for fluorescence H-1000, Vector Laboratories, Peterborough, UK). Images of 50 randomly selected cells from each sample were analyzed using the "comet score" software. DNA damage was calculated for each comet and was expressed as percent of DNA in the tail and as tail moment (defined as the product of the tail length and the fraction of total DNA in the tail). Data were averaged from three independent experiments and were expressed as means  $\pm$  standard error of the means (SEM).

## Statistical analysis

For statistical analysis we used the t-test (paired, two-tailed). A P-value >0.05 is not considered statistically significant and is not represented by any symbol. A P-value <0.05 is considered to correspond with statistical significance and is indicated with an asterisk (\*), a P-value <0.01 is indicated with a double asterisk (\*\*), and a P-value <0.001 is indicated with a triple asterisk (\*\*\*). When the cytotoxicity of a compound was evaluated against two cell

lines, the statistical analysis was carried out to compare the cytotoxicity of a particular concentration of the compound between both cell lines.

## RESULTS AND DISCUSSION

Ethyl (C2, **10**), butyl (C4, **11**), hexyl (C6, **12**), octyl (C8, **13**), decyl (C10, **14**), dodecyl (C12, **15**) and hexadecyl (C16, **16**) hydroxytyrosyl ethers were prepared from hydroxytyrosol (**1**) as shown in Figure 1, following a method previously described.<sup>23</sup> Decyl (**14**) and hexadecyl (**16**) hydroxytyrosol ethers were synthesized for the first time and were obtained in good yields. Spectral data of these compounds are in good agreement with the proposed structures.

The MTT assay was used to assess the cytotoxic activity of hydroxytyrosol (**1**) and its alkyl ethers (**10–16**) against A549 lung cancer cells and MRC5 non-malignant lung fibroblasts. The results, represented in Figure 2, show a direct relationship between the lipophilic nature of these compounds and their cytotoxic activity on A549 lung cancer cells. All compounds had certain selectivity for the cancer cell line, i.e., specific concentrations of these compounds induced a higher cytotoxicity in A549 cancer cells than in MRC5 normal cells. This selective cytotoxicity, however, was lower than that of the anticancer drug 5-fluorouracil (5-FU; positive control). Several compounds, including curcumin (a natural product currently undergoing clinical development for treatment of various cancers), the lipophilic compound beta-carotene and sodium hypochlorite (the principal constituent of bleach), were also screened against these two cell lines and showed very little or no selective



223 cytotoxicity (negative controls). IC<sub>50</sub> values were calculated for all tested compounds and are  
224 presented in Table 1.

225 Although hydroxytyrosyl hexadecyl ether was the most cytotoxic alkyl ether  
226 derivative in A549 cells, hydroxytyrosyl dodecyl ether (HTDE) showed the highest selective  
227 cytotoxic activity (Figure 2). The IC<sub>50</sub> value in the A549 cancer cell line was 2.46 times lower  
228 than in the normal MRC5 cell line for HTDE and 2.04 times for hydroxytyrosyl hexadecyl  
229 ether. Since HTDE was the most selective hydroxytyrosol alkyl ether derivative, our next  
230 goal was to evaluate possible mechanisms involved in this selective cytotoxicity. We initially  
231 tested the ability of HTDE to inhibit glycolysis. Evidence suggest that cancer cells have  
232 higher reliance on glycolysis for their survival than normal cells, and that the inhibition of  
233 glycolysis may cause selective anticancer effects.<sup>37-39</sup> The possible inhibition of glycolysis by  
234 HTDE was assessed by measuring concentrations of glucose (initial product of glycolysis)  
235 and lactate (final product of glycolysis) in control and treated A549 lung cancer cells. The  
236 results suggest that HTDE (10 and 32  $\mu$ M) induced a modest reduction in lactate production  
237 and glucose consumption, although only the reduction in lactate production induced by HTDE  
238 32  $\mu$ M was statistically significant (Figures 3A, B). This inhibition of glycolysis was lower  
239 than that induced by the glycolysis inhibitor dichloroacetate. 5-FU did not reduce either  
240 lactate production or glucose consumption (negative control). The percentages of lactate  
241 production and glucose consumption (means  $\pm$  SEM) induced by these compounds in relation  
242 to untreated cells were, respectively: HTDE 10  $\mu$ M ( $90.97 \pm 5.17$ ;  $95.10 \pm 5.70$ ), HTDE 32  
243  $\mu$ M ( $88.49 \pm 1.18$ ;  $88.78 \pm 4.15$ ), dichloroacetate 32 mM ( $55.89 \pm 1.33$ ;  $65.00 \pm 0.39$ ) and 5-  
244 FU 100  $\mu$ M ( $96.95 \pm 6.11$ ;  $99.99 \pm 5.00$ ).

245 We next evaluated whether the formation of reactive oxygen species (ROS) played a  
246 role in the cytotoxicity of HTDE. Accumulating data suggest that cancer cells have higher  
247 basal levels of ROS than non-malignant cells, and that the induction of a specific increase in

ROS levels by pro-oxidant agents may lead to cytotoxic concentrations in cancer cells but not in normal cells. Indeed, oxidative stress has been shown to play an important role in the anticancer activity of several chemotherapeutic agents commonly used in cancer treatment<sup>39-41</sup> and in the cytotoxic activity of many natural products.<sup>42</sup> Figure 3C shows that pre-incubation of A549 cells with MnTMPyP (a superoxide dismutase mimetic that prevent oxidative stress by reducing superoxide anion levels) reduced the cytotoxic activity of HTDE, therefore suggesting that the formation of superoxide anion may play a role in the cytotoxic activity of this compound.

DNA-damaging compounds (e.g. alkylating agents, cytotoxic antibiotics and DNA topoisomerase poisons) are the most widely used anticancer drugs. Unlike non-malignant cells, tumor cells commonly have mutations in DNA repair genes that hinder the proper repair some types of DNA damage. This may explain why specific DNA-damaging drugs can selectively kill tumor cells.<sup>43,44</sup> Figure 3C shows that the antioxidant MnTMPyP reduced the cytotoxic activity of HTDE, therefore suggesting that the induction of oxidative stress participates in its cytotoxicity. Since oxidative stress can cause DNA damage, we used the comet assay to test if HTDE could induce DNA damage in A549 cells. Figures 3D and 3E show that A549 cells exposed to HTDE had higher levels of DNA in the tail of the comets than untreated cells, therefore indicating that this compound induces DNA damage. The levels of DNA damage (expressed as percent of DNA in the tail and as tail moment) were lower than the induced by the DNA-damaging agent camptothecin.

We next used a panel of cell lines deficient in several DNA repair pathways to test if the induction of DNA damage by HTDE participates in its cytotoxic activity. All cell lines were treated with several concentrations of HTDE for 24 h and, after a recovery period of 24 h, cell viability was estimated with the MTT assay. The cytotoxic activity of HTDE against cells deficient in homologous recombination, non-homologous end joining, mismatch repair

and Fanconi anemia was similar than that against parental cells (results not shown), therefore indicating that the cytotoxic activity of this compound is not affected by defects in these DNA repair pathways. However, results represented in Figure 3F show that HTDE 10  $\mu$ M was more cytotoxic in cells deficient in base excision repair (EM9-V) than in parental cells (EM9-XH). HTDE was 1.6 fold more cytotoxic against EM9-V cells than on parental EM9-XH cells, with IC<sub>50</sub> values (means  $\pm$  SEM;  $\mu$ M) of  $9.09 \pm 0.75$  in EM9-V cells and  $14.59 \pm 0.64$  in EM9-XH cells. The base excision repair (BER) pathway plays a crucial role in the repair of oxidative DNA damage;<sup>45</sup> indeed, cells deficient in BER (EM9-V) have been shown to be more sensitive to hydrogen peroxide than parental cells (EM9-XH).<sup>46</sup> Under our experimental conditions, hydrogen peroxide was 3,8-fold more cytotoxic EM9-V cells than in EM9-XH cells (positive control), and hydroxytyrosol did not induce selective cytotoxicity in EM9-V cells vs. EM9-XH cells (negative control). Taken as a whole, our data suggest that HTDE induces oxidative damage that may participate in its cytotoxic activity.

Since most cancer chemotherapy regimens include a combination of drugs, we assessed the cytotoxic activity of HTDE in combination with the anticancer drugs 5-FU in A549 lung cancer cells and MRC5 non-malignant lung fibroblasts. Then, we calculated the parameter Combination Index (CI) with the computer software Compusyn; this parameter is based on the Chou-Talalay method and offers quantitative definition for additive effect (CI = 1), synergism (CI < 1), and antagonism (CI > 1) in drug combinations.<sup>47</sup> A549 and MRC5 cells were exposed for 48 h to HTDE (10 and 32  $\mu$ M) with and without 5-FU 10  $\mu$ M (HTDE and 5-FU were added simultaneously when tested in combination). Cell viability was then estimated with the MTT assay. Figure 4 shows that the combination of HTDE with 5-FU displayed a synergistic cytotoxicity in the A549 lung cancer cell line. Interestingly, the combination of HTDE with 5-FU induced an antagonism in the MRC5 non-malignant cell

line. In other words, HTDE and 5-FU given in combination killed more cancer cells and less normal cells than any of these compounds given individually.

Finally, to further investigate the selective cytotoxicity of HTDE against cancer cells, MCF7 breast cancer cells and MCF10 normal breast epithelial cells were exposed to several concentrations of this compound for 48 h and cell viability was estimated with the MTT assay. The parent compound hydroxytyrosol, the anticancer drug 5-FU, and the most cytotoxic hydroxytyrosol alkyl ether derivative in A549 lung cancer cells (hydroxytyrosyl hexadecyl ether) were also tested under these experimental conditions. Only HTDE induced a clear cytotoxic selectivity; HTDE was 6.16 times more cytotoxic against MCF7 cells than against MCF10 cells. The  $IC_{50}$  values (means  $\pm$  SEM;  $\mu$ M) in MCF10 normal breast epithelial cells and MCF7 breast cancer were, respectively: hydroxytyrosol ( $64.43 \pm 6.74$ ;  $50.16 \pm 2.27$ ); HTDE ( $29.50 \pm 2.07$ ;  $4.79 \pm 1.59$ ), 5- fluorouracil ( $< 0.1$ ;  $0.16 \pm 0.03$ ) and hydroxytyrosyl hexadecyl ether ( $9.79 \pm 1.11$ ;  $12.00 \pm 0.69$ ). Figure 5A shows that HTDE displayed a marked selective cytotoxic activity in the 1-30 micromolar range and that this highly selective cytotoxicity is not shared by the parent compound hydroxytyrosol or the anticancer drug 5-FU. Figure 5B seeks to visually show changes in cell number and morphology induced by each of these compounds in both cell lines. It is shown that hydroxytyrosol 100  $\mu$ M, HTDE 10  $\mu$ M and 5- FU 10  $\mu$ M induce similar changes in MCF7 breast cancer cells (reduction of cell number and alteration of cell morphology); however, HTDE is the only compound that does not appreciably alter the number and morphology of non-malignant MCF10 cells.

Our results suggest that HTDE has cancer chemotherapeutic potential rather than chemopreventive potential. Figure 5A shows that HTDE 3  $\mu$ M can inhibit the growth of MCF7 breast cancer cells without affecting the growth of MCF10 normal breast cells. It is unknown whether the oral administration of HTDE can lead to such concentrations in plasma and tissues. Previous experiments suggest that hydroxytyrosol alkyl ether derivatives are

stable when digested in vitro, are rapidly absorbed, and are metabolized only partially.<sup>27-29</sup> Indeed, HTDE and related hydroxytyrosol alkyl ether derivatives were found to exert a neuroprotective effect in rats when administered orally, therefore suggesting that HTDE is bioavailable after oral administration. In any case, the possible low oral bioavailability and high metabolism of HTDE could be overcome with a sustained intravenous infusion. This strategy could be used to obtain and maintain cytotoxic concentrations of HTDE in plasma and tissues, which would maximize its therapeutic potential. Future animal studies are needed to evaluate the anticancer potential of HTDE in vivo.

The possible exploitation of the biological properties of hydroxytyrosol alkyl ether derivatives described in this and previous reports<sup>25,26,30,31</sup> would require an adequate supply of these derivatives. Several million tons per year of wastes are estimated to be produced worldwide by the olive oil industry and, interestingly, hydroxytyrosol alkyl ether derivatives can be synthesized easily and in high yield using hydroxytyrosol obtained from olive oil waste waters.<sup>23,48</sup>

In summary, since accumulating data suggest that the olive oil constituent hydroxytyrosol has anticancer activity, we have evaluated the selective cytotoxic activity of a series of hydroxytyrosol alkyl ether derivatives in relation to that of hydroxytyrosol, and have investigated possible mechanisms involved in the cytotoxicity of the most selective compound (HTDE, **15**). Our results showed that the cytotoxic activity of HTDE was more potent and selective than that of its parent compound hydroxytyrosol.

342

## 343 REFERENCES

344

- 345 (1) Sofi, F.; Abbate, R.; Gensini, G. F.; Casini, A. Accruing evidence on benefits of  
346 adherence to the Mediterranean diet on health: an updated systematic review and  
347 meta-analysis. *Am. J. Clin. Nutr.* **2010**, *92*, 1189-1196.
- 348 (2) Kontou, N.; Psaltopoulou, T.; Panagiotakos, D.; Dimopoulos, M. A.; Linos, A. The  
349 mediterranean diet in cancer prevention: a review. *J. Med. Food.* **2011**, *14*, 1065-1078.
- 350 (3) Perez-Martinez, P.; Garcia-Rios, A.; Delgado-Lista, J.; Perez-Jimenez, F.; Lopez-  
351 Miranda, J. Mediterranean diet rich in olive oil and obesity, metabolic syndrome and  
352 diabetes mellitus. *Curr. Pharm. Des.* **2011**, *17*, 769-777.
- 353 (4) Urpi-Sarda, M.; Casas, R.; Chiva-Blanch, G.; Romero-Mamani, E. S.; Valderas-  
354 Martinez, P.; Arranz, S.; Andres-Lacueva, C.; Llorach, R.; Medina-Remon, A.;  
355 Lamuela-Raventos, R. M.; Estruch, R. Virgin olive oil and nuts as key foods of the  
356 Mediterranean diet effects on inflammatory biomarkers related to atherosclerosis.  
357 *Pharmacol. Res.* **2012**, *65*, 577-583.
- 358 (5) Covas, M. I.; Konstantinidou, V.; Fito, M. Olive oil and cardiovascular health. *J.*  
359 *Cardiovasc. Pharmacol.* **2009**, *54*, 477-482.
- 360 (6) Pelucchi, C.; Bosetti, C.; Negri, E.; Lipworth, L.; La Vecchia, C. Olive oil and cancer  
361 risk: an update of epidemiological findings through 2010. *Curr. Pharm. Des.* **2011**, *17*,  
362 805-812.
- 363 (7) Psaltopoulou, T.; Kosti, R. I.; Haidopoulos, D.; Dimopoulos, M.; Panagiotakos, D. B.  
364 Olive oil intake is inversely related to cancer prevalence: a systematic review and a  
365 meta-analysis of 13,800 patients and 23,340 controls in 19 observational studies.  
366 *Lipids Health Dis.* **2011**, *10*:127., 127.

- 367 (8) Ruiz-Canela, M.; Martinez-Gonzalez, M. A. Olive oil in the primary prevention of  
368 cardiovascular disease. *Maturitas*. **2011**, *68*, 245-250.
- 369 (9) Visioli, F.; Bernardini, E. Extra virgin olive oil's polyphenols: biological activities.  
370 *Curr. Pharm. Des.* **2011**, *17*, 786-804.
- 371 (10) Brenes, M.; Garcia, A.; Garcia, P.; Rios, J. J.; Garrido, A. Phenolic compounds in  
372 Spanish olive oils. *J. Agric. Food Chem.* **1999**, *47*, 3535-3540.
- 373 (11) Granados-Principal, S.; Quiles, J. L.; Ramirez-Tortosa, C. L.; Sanchez-Rovira, P.;  
374 Ramirez-Tortosa, M. C. Hydroxytyrosol: from laboratory investigations to future  
375 clinical trials. *Nutr. Rev.* **2010**, *68*, 191-206.
- 376 (12) Cornwell, D. G.; Ma, J. Nutritional benefit of olive oil: the biological effects of  
377 hydroxytyrosol and its arylating quinone adducts. *J. Agric. Food Chem.* **2008**, *56*,  
378 8774-8786.
- 379 (13) Hagiwara, K.; Goto, T.; Araki, M.; Miyazaki, H.; Hagiwara, H. Olive polyphenol  
380 hydroxytyrosol prevents bone loss. *Eur. J. Pharmacol.* **2011**, *662*, 78-84.
- 381 (14) Laurent-Thibault, C.; Arseneault, M.; Longpre, F.; Ramassamy, C. Tyrosol and  
382 hydroxytyrosol, two main components of olive oil, protect N2a cells against amyloid-  
383 beta-induced toxicity. Involvement of the NF-kappaB signaling. *Curr. Alzheimer Res.*  
384 **2011**, *8*, 543-551.
- 385 (15) Rafehi, H.; Smith, A. J.; Balcerczyk, A.; Ziemann, M.; Ooi, J.; Loveridge, S. J.; Baker,  
386 E. K.; El Osta, A.; Karagiannis, T. C. Investigation into the biological properties of the  
387 olive polyphenol, hydroxytyrosol: mechanistic insights by genome-wide mRNA-Seq  
388 analysis. *Genes Nutr.* **2012**, *7*, 343-355.



- 389 (16) Ragione, F. D.; Cucciolla, V.; Borriello, A.; Pietra, V. D.; Pontoni, G.; Racioppi, L.;  
390 Manna, C.; Galletti, P.; Zappia, V. Hydroxytyrosol, a natural molecule occurring in  
391 olive oil, induces cytochrome c-dependent apoptosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*  
392 **2000**, 278, 733-739.
- 393 (17) Fabiani, R.; De Bartolomeo, A.; Rosignoli, P.; Servili, M.; Montedoro, G. F.; Morozzi,  
394 G. Cancer chemoprevention by hydroxytyrosol isolated from virgin olive oil through  
395 G1 cell cycle arrest and apoptosis. *Eur. J. Cancer Prev.* **2002**, 11, 351-358.
- 396 (18) Han, J.; Talorete, T. P.; Yamada, P.; Isoda, H. Anti-proliferative and apoptotic effects  
397 of oleuropein and hydroxytyrosol on human breast cancer MCF-7 cells.  
398 *Cytotechnology.* **2009**, 59, 45-53.
- 399 (19) Sirianni, R.; Chimento, A.; De Luca, A.; Casaburi, I.; Rizza, P.; Onofrio, A.; Iacopetta,  
400 D.; Puoci, F.; Ando, S.; Maggiolini, M.; Pezzi, V. Oleuropein and hydroxytyrosol  
401 inhibit MCF-7 breast cancer cell proliferation interfering with ERK1/2 activation. *Mol.*  
402 *Nutr. Food Res.* **2010**, 54, 833-840.
- 403 (20) Bouallagui, Z.; Han, J.; Isoda, H.; Sayadi, S. Hydroxytyrosol rich extract from olive  
404 leaves modulates cell cycle progression in MCF-7 human breast cancer cells. *Food*  
405 *Chem. Toxicol.* **2011**, 49, 179-184.
- 406 (21) Granados-Principal, S.; Quiles, J. L.; Ramirez-Tortosa, C.; Camacho-Corencia, P.;  
407 Sanchez-Rovira, P.; Vera-Ramirez, L.; Ramirez-Tortosa, M. C. Hydroxytyrosol  
408 inhibits growth and cell proliferation and promotes high expression of sfrp4 in rat  
409 mammary tumours. *Mol. Nutr. Food Res.* **2011**, 55 Suppl 1:S117-26. doi:  
410 10.1002/mnfr.201000220. Epub; %2010 Dec 1., S117-S126.

- 411 (22) Alcudia, F.; Cert, A.; Espartero, J. L.; Mateos, R.; Trujillo, M. Method of preparing  
412 hydroxytyrosol esters, esters thus obtained and use of same. *PCT WO 2004/005237*  
413 **2004**.
- 414 (23) Madrona, A.; Pereira-Caro, G.; Mateos, R.; Rodriguez, G.; Trujillo, M.; Fernandez-  
415 Bolanos, J.; Espartero, J. L. Synthesis of hydroxytyrosyl alkyl ethers from olive oil  
416 waste waters. *Molecules*. **2009**, *14*, 1762-1772.
- 417 (24) Trujillo, M.; Mateos, R.; Collantes, d. T.; Espartero, J. L.; Cert, R.; Jover, M.; Alcudia,  
418 F.; Bautista, J.; Cert, A.; Parrado, J. Lipophilic hydroxytyrosyl esters. Antioxidant  
419 activity in lipid matrices and biological systems. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54*,  
420 3779-3785.
- 421 (25) Pereira-Caro, G.; Madrona, A.; Bravo, L.; Espartero, J. L.; Alcudia, F.; Cert, A.;  
422 Mateos, R. Antioxidant activity evaluation of alkyl hydroxytyrosyl ethers, a new class  
423 of hydroxytyrosol derivatives. *Food Chem.* **2009**, *115*, 86-91.
- 424 (26) Pereira-Caro, G.; Sarria, B.; Madrona, A.; Espartero, J. L.; Goya, L.; Bravo, L.;  
425 Mateos, R. Alkyl hydroxytyrosyl ethers show protective effects against oxidative  
426 stress in HepG2 cells. *J. Agric. Food Chem.* **2011**, *59*, 5964-5976.
- 427 (27) Pereira-Caro, G.; Bravo, L.; Madrona, A.; Espartero, J. L.; Mateos, R. Uptake and  
428 metabolism of new synthetic lipophilic derivatives, hydroxytyrosyl ethers, by human  
429 hepatoma HepG2 cells. *J. Agric. Food Chem.* **2010**, *58*, 798-806.
- 430 (28) Pereira-Caro, G.; Mateos, R.; Saha, S.; Madrona, A.; Espartero, J. L.; Bravo, L.;  
431 Kroon, P. A. Transepithelial Transport and Metabolism of New Lipophilic Ether  
432 Derivatives of Hydroxytyrosol by Enterocyte-like Caco-2/TC7 Cells. *J. Agric. Food*  
433 *Chem.* **2010**, *58*, 11501-11509.

- 434 (29) Pereira-Caro, G.; Sarria, B.; Madrona, A.; Espartero, J. L.; Escuderos, M. E.; Bravo,  
435 L.; Mateos, R. Digestive stability of hydroxytyrosol, hydroxytyrosyl acetate and alkyl  
436 hydroxytyrosyl ethers. *Int. J. Food Sci. Nutr.* **2012**, *63*, 703-707.
- 437 (30) Reyes, J. J.; De La Cruz, J. P.; Munoz-Marin, J.; Guerrero, A.; Lopez-Villodres, J. A.;  
438 Madrona, A.; Espartero, J. L.; Gonzalez-Correa, J. A. Antiplatelet effect of new  
439 lipophilic hydroxytyrosol alkyl ether derivatives in human blood. *Eur. J. Nutr.* **2012**,  
440 *52*, 591-599.
- 441 (31) Munoz-Marin, J.; De La Cruz, J. P.; Guerrero, A.; Lopez-Leiva, I.; Lopez-Villodres, J.  
442 A.; Reyes, J. J.; Espartero, J. L.; Madrona, A.; Labajos, M. T.; Gonzalez-Correa, J. A.  
443 Cytoprotective effect of hydroxytyrosyl alkyl ether derivatives after oral  
444 administration to rats in a model of glucose-oxygen deprivation in brain slices. *J.*  
445 *Agric. Food Chem.* **2012**, *60*, 7659-7664.
- 446 (32) Bryant, H. E.; Ying, S.; Helleday, T. Homologous recombination is involved in repair  
447 of chromium-induced DNA damage in mammalian cells. *Mutat. Res.* **2006**, *599*, 116-  
448 123.
- 449 (33) Meschini, R.; Marotta, E.; Berni, A.; Filippi, S.; Fiore, M.; Mancinelli, P.; Natarajan,  
450 A. T.; Palitti, F. DNA repair deficiency and BPDE-induced chromosomal alterations  
451 in CHO cells. *Mutat. Res.* **2008**, *637*, 93-100.
- 452 (34) Cao, X.; Bloomston, M.; Zhang, T.; Frankel, W. L.; Jia, G.; Wang, B.; Hall, N. C.;  
453 Koch, R. M.; Cheng, H.; Knopp, M. V.; Sun, D. Synergistic antipancreatic tumor  
454 effect by simultaneously targeting hypoxic cancer cells with HSP90 inhibitor and  
455 glycolysis inhibitor. *Clin. Cancer Res.* **2008**, *14*, 1831-1839.

- 456 (35) Singh, N. P.; McCoy, M. T.; Tice, R. R.; Schneider, E. L. A simple technique for  
457 quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell Res.* **1988**,  
458 *175*, 184-191.
- 459 (36) Pastor, N.; Lopez-Lazaro, M.; Tella, J. L.; Baos, R.; Hiraldo, F.; Cortes, F.  
460 Assessment of genotoxic damage by the comet assay in white storks (*Ciconia ciconia*)  
461 after the Donana Ecological Disaster. *Mutagenesis.* **2001**, *16*, 219-223.
- 462 (37) Pelicano, H.; Martin, D. S.; Xu, R. H.; Huang, P. Glycolysis inhibition for anticancer  
463 treatment. *Oncogene.* **2006**, *25*, 4633-4646.
- 464 (38) Lopez-Lazaro, M. The Warburg effect: why and how do cancer cells activate  
465 glycolysis in the presence of oxygen? *Anticancer Agents Med. Chem.* **2008**, *8*, 305-  
466 312.
- 467 (39) Lopez-Lazaro, M. A new view of carcinogenesis and an alternative approach to cancer  
468 therapy. *Mol. Med.* **2010**, *16*, 144-153.
- 469 (40) Alexandre, J.; Batteux, F.; Nicco, C.; Chereau, C.; Laurent, A.; Guillevin, L.; Weill,  
470 B.; Goldwasser, F. Accumulation of hydrogen peroxide is an early and crucial step for  
471 paclitaxel-induced cancer cell death both in vitro and in vivo. *Int. J Cancer.* **2006**, *119*,  
472 41-48.
- 473 (41) Lopez-Lazaro, M. Dual role of hydrogen peroxide in cancer: Possible relevance to  
474 cancer chemoprevention and therapy. *Cancer Lett.* **2007**, *252*, 1-8.
- 475 (42) Martin-Cordero, C.; Leon-Gonzalez, A. J.; Calderon-Montano, J. M.; Burgos-Moron,  
476 E.; Lopez-Lazaro, M. Pro-oxidant natural products as anticancer agents. *Curr. Drug*  
477 *Targets.* **2012**, *13*, 1006-1028.

- 478 (43) Helleday, T.; Petermann, E.; Lundin, C.; Hodgson, B.; Sharma, R. A. DNA repair  
479 pathways as targets for cancer therapy. *Nat. Rev. Cancer*. **2008**, *8*, 193-204.
- 480 (44) Luo, J.; Solimini, N. L.; Elledge, S. J. Principles of cancer therapy: oncogene and non-  
481 oncogene addiction. *Cell*. **2009**, *136*, 823-837.
- 482 (45) Svilar, D.; Goellner, E. M.; Almeida, K. H.; Sobol, R. W. Base excision repair and  
483 lesion-dependent subpathways for repair of oxidative DNA damage. *Antioxid. Redox.*  
484 *Signal*. **2011**, *14*, 2491-2507.
- 485 (46) Loizou, J. I.; El Khamisy, S. F.; Zlatanou, A.; Moore, D. J.; Chan, D. W.; Qin, J.;  
486 Sarno, S.; Meggio, F.; Pinna, L. A.; Caldecott, K. W. The protein kinase CK2  
487 facilitates repair of chromosomal DNA single-strand breaks. *Cell*. **2004**, *117*, 17-28.
- 488 (47) Chou, T. C. Drug combination studies and their synergy quantification using the  
489 Chou-Talalay method. *Cancer Res*. **2010**, *70*, 440-446.
- 490 (48) Arvanitoyannis, I. S.; Kassaveti, A.; Stefanatos, S. Olive oil waste treatment: a  
491 comparative and critical presentation of methods, advantages & disadvantages. *Crit*  
492 *Rev. Food Sci. Nutr*. **2007**, *47*, 187-229.
- 493
- 494
- 495 We thank the *Consejería de Innovación, Ciencia y Empresa* of the *Junta de Andalucía* (Spain)  
496 for financial support (grant no. P09-AGR-5098).

**FIGURE CAPTIONS**

**Figure 1.** Synthetic procedure of the alkyl hydroxytyrosyl ether derivatives (**10–16**).

**Figure 2.** Selective cytotoxicity of hydroxytyrosol and several alkyl hydroxytyrosyl ether derivatives (**10–16**). The percentage of cell viability ( $\pm$  SEM) in A549 cancer cells and MRC5 normal cells exposed for 48 h to hydroxytyrosol (**1**), its alkyl ether derivatives (**10–16**) and 5-fluorouracil (5-FU) was determined with the MTT assay.

**Figure 3.** Possible mechanisms of action involved in the cytotoxicity of hydroxytyrosyl dodecyl ether (HTDE, **15**). **A)** Percentage of lactate produced by cells exposed for 8 h to HTDE (**15**), dichloroacetate (DCA) and 5-fluorouracil (5-FU) in relation to untreated cells (control). **B)** Percentage of glucose consumed by cells exposed for 8 h to HTDE, DCA and 5-FU in relation to untreated cells. **C)** Prevention of HTDE -induced cell death in A549 cells by the superoxide dismutase mimetic MnTMPyP (MTT assay); A549 cells were exposed to HTDE for 48 h in the presence and absence of MnTMPyP (added 1 h before HTDE). **D)** Representative photographs of untreated cells, of cells treated with the DNA damaging agent camptothecin (cpt), and of cells exposed for 2 h and 24 h to HTDE 32  $\mu$ M and 100  $\mu$ M (comet assay). **E)** Quantification of DNA damage (comet assay) expressed as percent of DNA damage in tail and as tail moment (tail length  $\times$  percentage of DNA in the tail). **F)** Cells mutated in XRCC1 (deficient in base excision repair) are more sensible than parental cells to the cytotoxic activity of HTDE. Both cell lines were treated with several concentrations of HTDE for 24 h and, after a recovery period of 24 h, cell viability was estimated with the MTT assay.

520

521 **Figure 4.** Cytotoxic activity of hydroxytyrosyl dodecyl ether in combination with the  
522 anticancer drugs 5-fluorouracil. A549 cancer cells and MRC5 normal cells were exposed for  
523 48 h to hydroxytyrosyl dodecyl ether (HTDE, **15**) alone and in combination with 5-  
524 fluorouracil (5-FU). The percentage of cell viability (means  $\pm$  SEM) was determined with the  
525 MTT assay and the parameter Combination Index (CI) was calculated with the computer  
526 software Compusyn. A CI value  $<1$  is considered to be synergism and is represented by  
527 “+++++” for very strong synergism (CI $<0.1$ ), “++++” for strong synergism (CI=0.1-0.3),  
528 “+++” for synergism (CI=0.3-0.7), “++” for moderate synergism (CI=0.7-0.85) and “+” for  
529 slight synergism (CI=0.85-0.9). A CI value between 0.9 and 1.1 corresponds with additive  
530 effect and is indicated with “ $\pm$ ”. A CI value  $>1$  is considered to be antagonism and is  
531 represented by “-” for slight antagonism (CI=1.1-1.2), “--” for moderated antagonism  
532 (CI=1.2-1.45), “---” for antagonism (CI=1.45-3.3), “----” for strong antagonism (CI=3.3-10)  
533 and “-----” for very strong antagonism (CI $>10$ ).

534

535 **Figure 5.** MCF7 breast cancer cells are more sensitive than MCF10 normal breast epithelial  
536 cells to the cytotoxic activity of hydroxytyrosyl dodecyl ether (HTDE, **15**). **A)** Percentages of  
537 cell viability (means  $\pm$  SEM) in MCF10 and MCF7 cells exposed to hydroxytyrosol, HTDE  
538 and 5-FU for 48 h (MTT assay). **B)** Representative photographs of MCF10 and MCF7 cells  
539 after treatment with hydroxytyrosol (100  $\mu$ M), HTDE (10  $\mu$ M) and 5-FU (10  $\mu$ M) for 48 h.



**Table 1.** IC<sub>50</sub> Values of Hydroxytyrosol, Several Alkyl Hydroxytyrosyl Ether Derivatives, 5-Fluorouracil (Positive Control), and Several Compounds (Negative Controls) in A549 Lung Cancer Cells and MRC5 Normal Lung Cells (MTT Assay).

COMPOUND	IC <sub>50</sub> (means ± SEM; µM)		P-value
	MRC5	A549	
Hydroxytyrosol	379.7 ± 54.9	147.0 ± 16.5	0.0008
Hydroxytyrosyl ethyl ether	166.5 ± 7.8	86.1 ± 14.4	0.0002
Hydroxytyrosyl butyl ether	78.9 ± 13.3	43.8 ± 3.4	0.0098
Hydroxytyrosyl hexyl ether	131.6 ± 6.0	41.2 ± 2.2	0.0001
Hydroxytyrosyl octyl ether	44.0 ± 1.5	30.0 ± 4.5	0.0367
Hydroxytyrosyl decyl ether	47.1 ± 6.1	28.2 ± 2.4	0.0097
Hydroxytyrosyl dodecyl ether	49.0 ± 4.3	19.9 ± 4.6	0.0164
Hydroxytyrosyl hexadecyl ether	14.7 ± 0.8	7.2 ± 1.3	0.0056
5-Fluorouracil	> 1000	4.8 ± 0.5	-
Curcumin	16.3 ± 0.3	16.5 ± 0.7	0.8255
Beta-carotene	311.9 ± 1.3	289.0 ± 2.3	0.0049
Sodium hypochlorite	0.8 ± 0.2 mM	1.7 ± 0.1 mM	0.0373

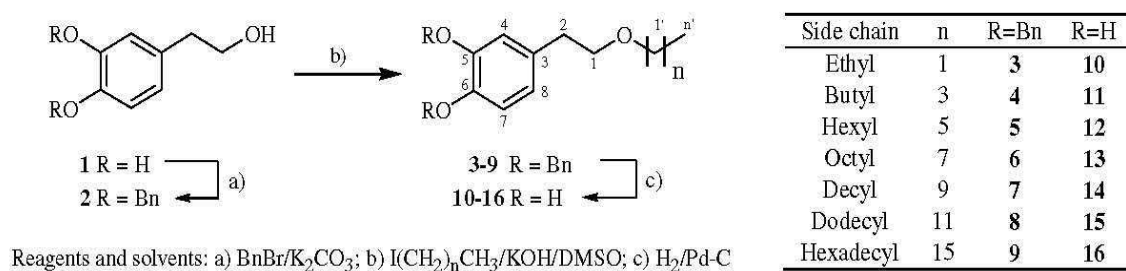


Figure 1

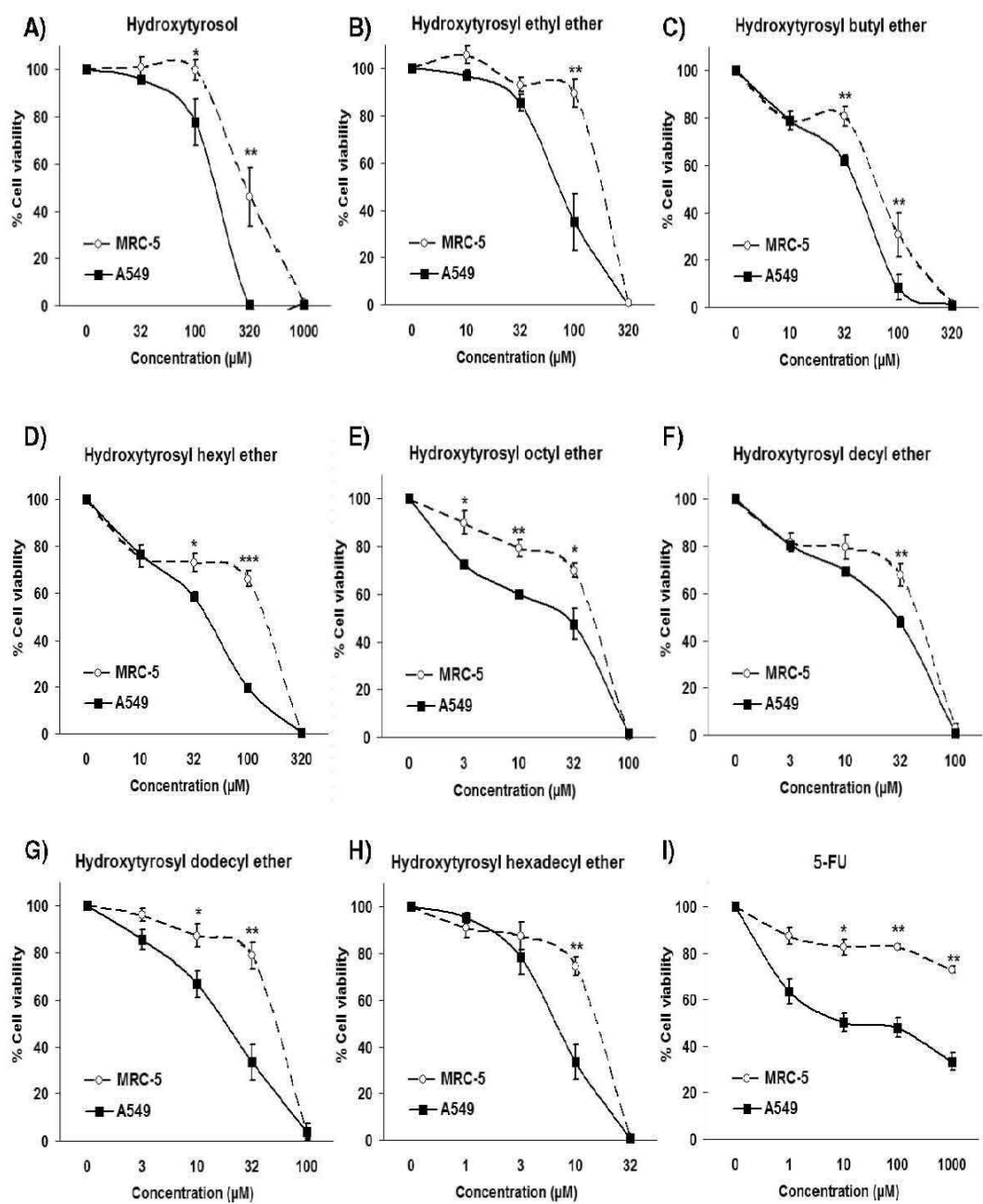


Figure 2

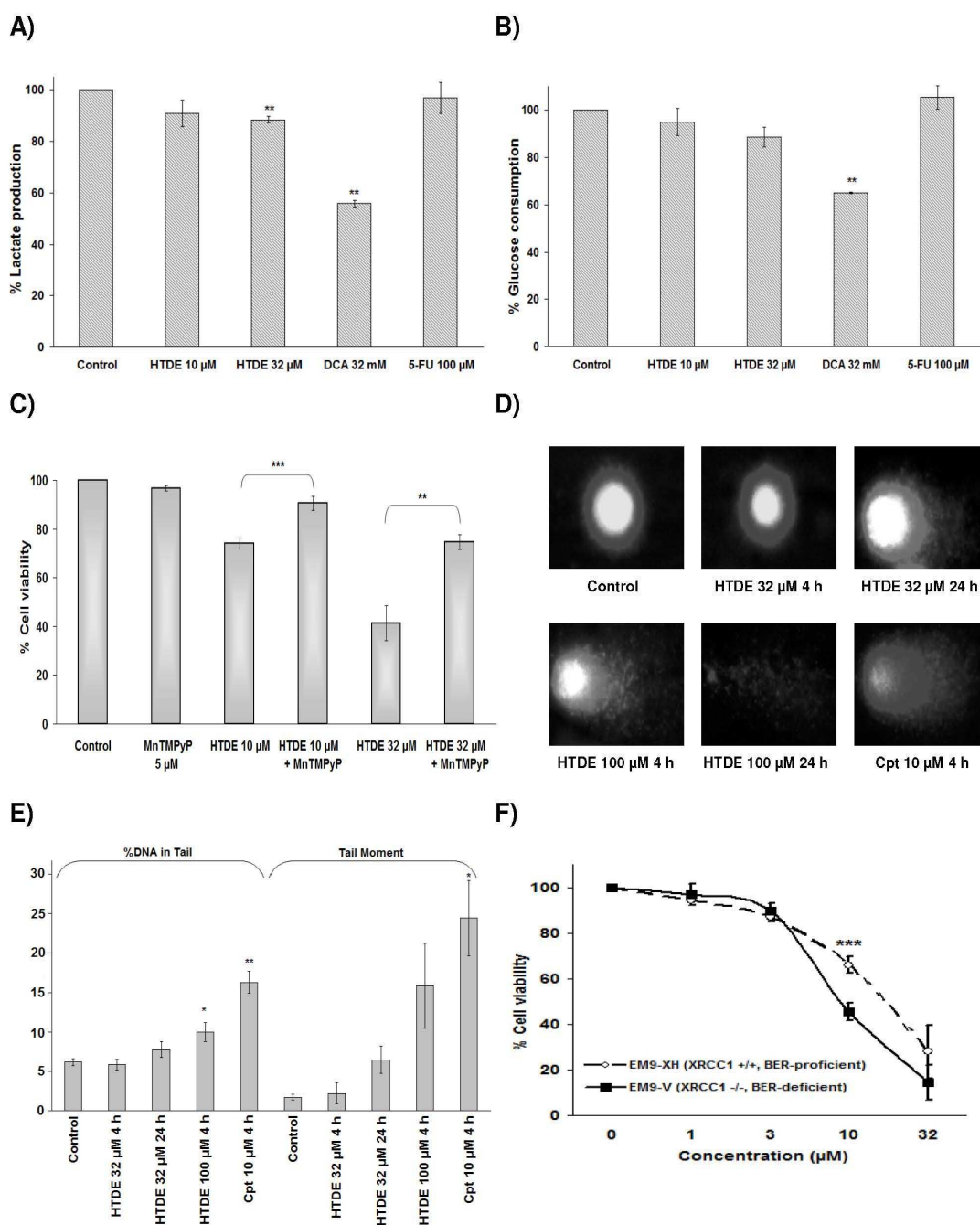


Figure 3

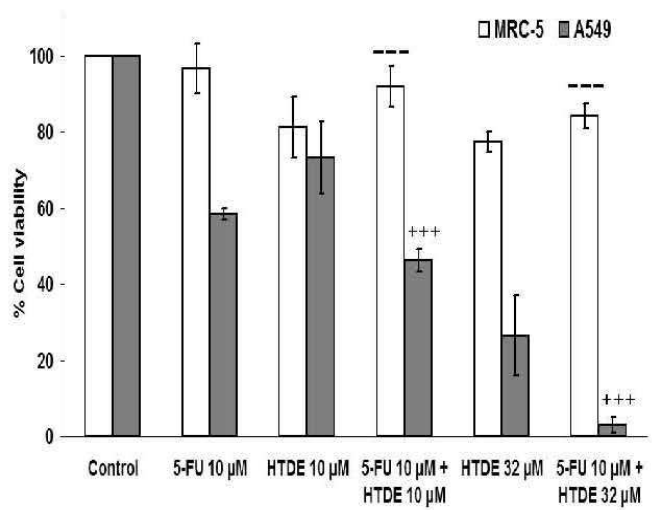


Figure 4

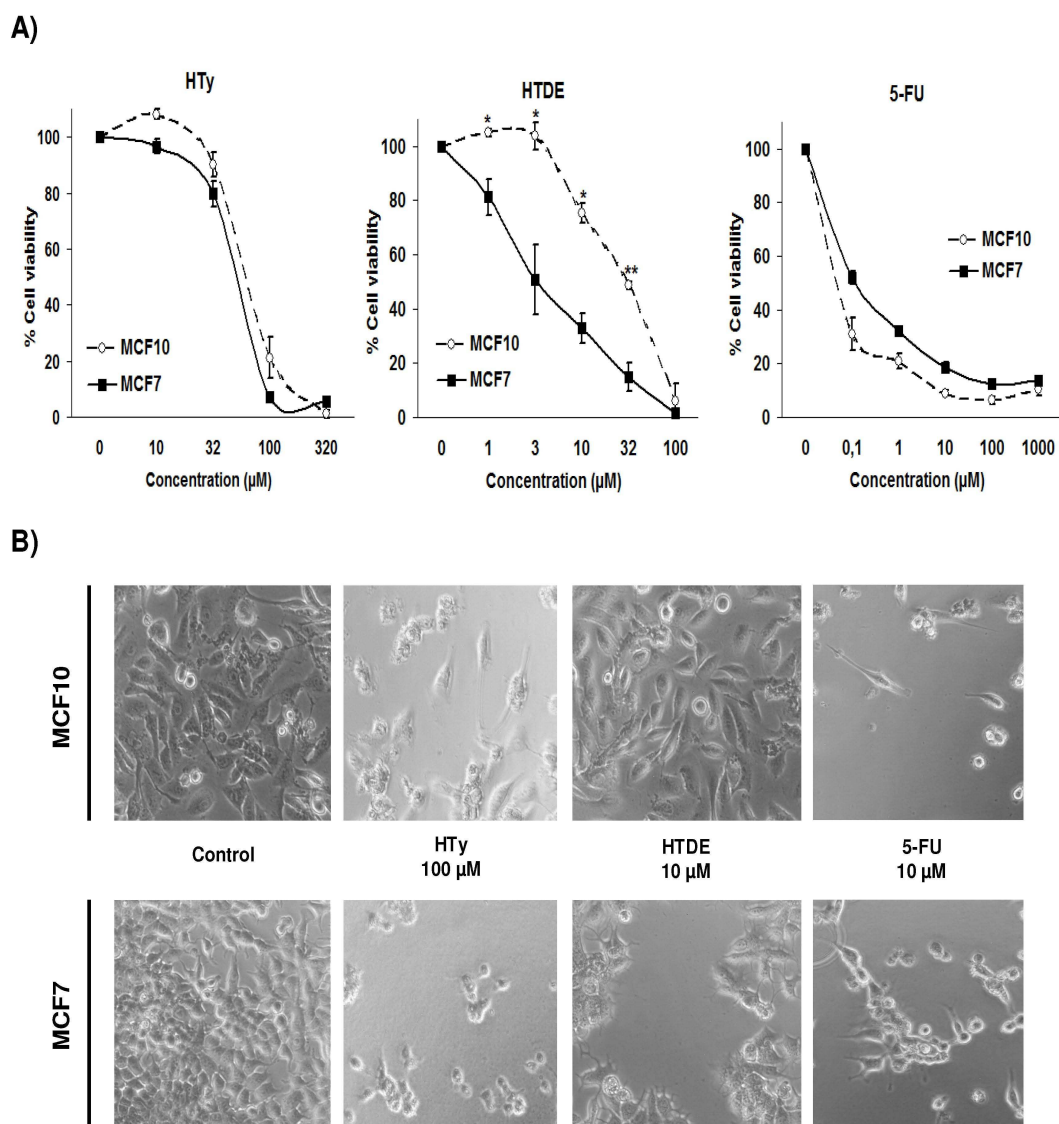


Figure 5

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 6.7. EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO DE HOJAS DE *NERIUM OLEANDER* L.

En la búsqueda de nuevos fármacos anticancerosos más selectivos, las plantas y productos naturales siguen siendo una fuente de investigación importante. En los últimos años, se ha empezado a valorar el uso de los heterósidos cardiotónicos como compuestos de origen natural con posible potencial anticanceroso<sup>134-136</sup>. Los heterósidos cardiotónicos han sido aislados de numerosas especies vegetales. Entre ellas destaca *Nerium oleander* por su elevado contenido en heterósidos cardiotónicos<sup>137,138</sup>. *N. oleander* ha sido utilizada en la medicina tradicional para el tratamiento de numerosas enfermedades, incluyendo el tratamiento de tumores sólidos<sup>137</sup>. La posible actividad antitumoral de *N. oleander* se debe a su contenido en heterósidos cardiotónicos (como la oleandrina) y triterpenos que han demostrado actividad anticancerosa en varios estudios *in vitro*<sup>137,139-141</sup>. En la actualidad existen dos extractos de *N. oleander* patentados, “Anvirzel” y “Breastin”. La administración de “Anvirzel” es segura en humanos<sup>142</sup> y se encuentra en ensayos clínicos en fase I para el tratamiento del cáncer.

Durante esta tesis se ha valorado la posible actividad selectiva de un extracto hidroalcohólico de *N. oleander* en un modelo *in vitro* de cáncer de pulmón y los posibles mecanismos implicados en la selectividad de este extracto. Los resultados obtenidos se encuentran recogidos en el manuscrito titulado *A hydroalcoholic extract from the leaves of Nerium oleander L. inhibits glycolysis and induces selective killing of lung cancer cells*, el cual se encuentra en revisión en la revista *Planta Medica*, que se comenta y adjunta a continuación.

En primer lugar se preparó el extracto hidroalcohólico de *Nerium oleander* (NOE) y se determinó su contenido en heterósidos cardiotónicos totales mediante la reacción de Kedde, que fue de un  $4,8\% \pm 0,3\%$ .

Una vez elaborado el extracto, se realizó el ensayo MTT para evaluar su posible actividad anticancerosa selectiva. NOE demostró tener mayor actividad citotóxica frente a células cancerosas de pulmón A549 que frente a células normales de pulmón MRC-5 (Figura 1 artículo adjunto (Figura 56)). Aunque esta actividad anticancerosa selectiva de NOE fue similar a la mostrada por cisplatino (fármaco anticanceroso utilizado de referencia), el valor de IC<sub>50</sub> de NOE fue casi 10 veces menor que el valor de IC<sub>50</sub> de cisplatino para células A549, siendo 0,27 µg/ml y 3,52 µg/ml respectivamente.

También se evaluó la actividad citotóxica de NOE en otras líneas celulares cancerosas: células de cáncer colorrectal HT29 y células de melanoma UACC-62. Ambas líneas demostraron ser más resistentes que las células cancerosas de pulmón A549, siendo la IC<sub>50</sub> casi 15 veces mayor para HT29 y 6 veces mayor para UACC-62 que la IC<sub>50</sub> mostrada para A549. Estos datos indican que NOE inhibe selectivamente el crecimiento de células cancerosas A549.



## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El siguiente paso fue la evaluación de los posibles mecanismos involucrados en la citotoxicidad selectiva de NOE. Como se ha comentado en apartados anteriores, se sabe que las células cancerosas son más susceptibles al aporte exógeno de EROs que las células normales, al tener las células tumorales mayores niveles basales de EROs, por lo que con un aporte exógeno de EROs específico se alcanzará niveles citotóxicos para células cancerosas sin alcanzar estos niveles en las células normales. La generación de estrés oxidativo está involucrada en el efecto citotóxico de oleandrina, un heterósido cardiotónico que se encuentra en *N. oleander*<sup>140</sup>. Para valorar si la formación de EROs estaba involucrada en la citotoxicidad de NOE, células A549 fueron tratadas con NOE en presencia o ausencia de antioxidantes (catalasa y n-acetilcisteína). La Figura 2 del artículo adjunto (Figura 57) demuestra que la citotoxicidad de NOE fue ligeramente reducida, pero de forma significativa, por la presencia de ambos antioxidantes. Estos datos quieren decir que aunque no sea el mecanismo principal, la generación de EROs participa en la citotoxicidad de NOE.

Otro posible mecanismo de la actividad anticancerosa selectiva demostrada por NOE podría ser la generación de un tipo de daño específico en el ADN. Compuestos que dañan el ADN han demostrado actividad anticancerosa selectiva debido a que ciertos tumores presentan alteraciones en las vías de reparación del daño inducido por estos compuestos, por lo que son más sensibles a ellos que las células normales<sup>15</sup>. Estudios previos han demostrado que algunos heterósidos cardiotónicos inducen daño en el ADN<sup>143,144</sup>. Para evaluar si la generación de daño en el ADN estaba involucrado en el mecanismo citotóxico de NOE, células VC8 (deficientes en HR) y células VC8-B2 (con HR funcional) fueron expuestas 48 h a varias concentraciones de NOE y medida su viabilidad mediante MTT. Debido a que estas líneas celulares son de origen murino, las concentraciones de NOE tuvieron que ser aumentadas puesto que se sabe que las células de roedores son más de 100 veces más resistentes a los heterósidos cardiotónicos que las células humanas<sup>145</sup>. Las células deficientes en HR fueron ligeramente, pero significativamente, más sensibles a la citotoxicidad inducida por NOE (Figura 3A del artículo adjunto (Figura 58)). Esta mayor sensibilidad de las células deficientes también pudo observarse mediante el ensayo inmunofluorescente de focos de  $\gamma$ H2AX. Las células deficientes en HR presentaron mayores roturas de doble cadena (señalizados por la  $\gamma$ H2AX) que las células con HR funcional tras 24 horas de tratamiento con NOE, debido a su incapacidad para reparar el daño en el ADN inducido por NOE (Figuras 3B y 3C del artículo adjunto (Figura 58)). Por tanto, la generación de daño en el ADN está involucrada en la citotoxicidad de NOE.

En los últimos años se ha empezado a barajar la glicólisis como diana terapéutica contra el cáncer, puesto que se sabe que las células cancerosas dependen de la glicólisis en mayor medida que las células normales<sup>25,76,146</sup>. Algunos heterósidos cardiotónicos son capaces de inhibir la glicólisis en células no cancerosas<sup>147,148</sup>. Todo esto hizo pensar que quizás NOE

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

podiera estar inhibiendo la glicólisis. Para comprobar esta posibilidad, células A549 fueron expuestas a distintas concentraciones de NOE durante 8 h. Finalizado el tratamiento, las concentraciones de glucosa (producto inicial de la glicólisis) y de lactato (producto final de la glicólisis) fueron medidas. NOE demostró una marcada disminución de producción de lactato y de consumo de glucosa (Figura 4 del artículo adjunto (Figura 59)), comparable al observado en las células que fueron expuestas al control positivo dicloroacetato (inhibidor de la glicólisis). Por tanto, NOE indujo una marcada inhibición de la glicólisis en las células A549. Esta inhibición de la glicólisis puede participar en la citotoxicidad de NOE, pero no está claro si es la responsable de la selectividad mostrada sobre células cancerosas. Esto se debe a que la inhibición de la glicólisis puede ser una consecuencia de la inhibición de la bomba  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasa por los heterósidos cardiotónicos que contiene NOE<sup>149</sup>. La expresión de la bomba  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasa es diferente según el tipo celular. Hay estudios que sugieren que la diferencia de susceptibilidad a la citotoxicidad de heterósidos cardiotónicos se debe a esas diferencias en la expresión y localización celular de la bomba  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasa<sup>150,151</sup>. Por tanto, para poder conocer si la inhibición de la glicólisis mostrada por NOE es la responsable de la actividad citotóxica selectiva, es necesario un estudio de la posible asociación entre la expresión de la bomba  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasa y la habilidad de los heterósidos cardiotónicos para inhibir la glicólisis.

En la terapia del cáncer, la combinación de fármacos es una herramienta terapéutica muy utilizada. La combinación se debe hacer entre fármacos que no presenten antagonismo entre ellos. Para poder evaluar la compatibilidad de NOE con cisplatino, fármaco de primer línea en el tratamiento del cáncer de pulmón, se estudió el efecto sobre la viabilidad celular en A549 tras la combinación de estos dos compuestos. El análisis del efecto combinatorio se realizó con el software Compusyn, con el que se calculó el parámetro de Índice de Combinación o CI. Células que fueron expuestas previamente a NOE antes que a cisplatino mostraron un moderado efecto antagónico, mientras que el tratamiento previo con cisplatino seguido de NOE presentó un moderado sinergismo (Tabla 1 del artículo adjunto (Tabla 8)). El moderado efecto antagónico observado cuando células fueron tratadas con NOE antes que con cisplatino podría deberse a la implicación en la acumulación intracelular de cisplatino por la bomba  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasa<sup>152</sup>.

En conclusión, NOE ha demostrado actividad citotóxica selectiva frente a células de cáncer de pulmón. En el efecto citotóxico de NOE están involucradas la formación de EROs, la generación de daño en el ADN y la inhibición de la glicólisis. Estos datos junto con el efecto sinérgico observado con la combinación con cisplatino apoyan la posible utilización de extractos de las hojas de *Nerium oleander* en ensayos clínicos para el tratamiento de cáncer de pulmón.

## **6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

**A hydroalcoholic extract from the leaves of *Nerium oleander* L. inhibits glycolysis and induces selective killing of lung cancer cells**

José Manuel Calderón-Montaña, Estefanía Burgos-Morón, Manuel Luis Orta, Santiago Mateos, Miguel López-Lázaro \*

*Department of Pharmacology, Faculty of Pharmacy, University of Seville, Seville, Spain*

*Department of Cell Biology, Faculty of Biology, University of Seville, Seville, Spain*

\*Correspondence to:

Dr. M. López-Lázaro  
Associate Professor  
Department of Pharmacology, Faculty of Pharmacy, C/ Profesor Garcia Gonzalez 2, 41012  
Sevilla, Spain.  
Phone: + 34 954 55 63 48  
Fax: + 34 954 55 60 74  
E-mail: [mlopezlazaro@us.es](mailto:mlopezlazaro@us.es)

## Abstract

Recent evidence suggests that cardiac glycosides might be used for the treatment of cancer. The ornamental shrub *Nerium oleander* L. (Apocynaceae) has been used in traditional medicine for treating several disorders including cancer, and extracts from the leaves of this plant have already entered Phase I clinical trials. In this communication, we have prepared a hydroalcoholic extract from the leaves of *Nerium oleander* (containing  $4.75 \pm 0.32$  % of cardenolides) and have assessed its cytotoxic activity in A549 lung cancer cells vs. MRC5 non-malignant lung fibroblasts. The results showed that the cytotoxicity of the *Nerium oleander* extract (NOE) against the cancer cell line was significantly higher than that against the non-malignant cell line, with a potency and selectivity similar to those of the anticancer drug cisplatin. Pre-treatment of A549 cells with the antioxidants *N*-acetylcysteine and catalase slightly prevented the cytotoxicity of the extract, therefore suggesting that the formation of reactive oxygen species participates in its cytotoxic activity but do not play a major role. NOE-induced cytotoxicity and DNA damage (gamma-H2AX focus formation) were slightly higher in cells lacking BRCA2 (deficient in homologous recombination repair) than in parental cells; this indicates that the induction DNA damage may also play a role in the cytotoxicity of the extract. NOE induced a marked inhibition of glycolysis (glucose consumption and lactate production) in A549 cells, comparable to that of the glycolysis inhibitor dichloroacetate (currently in clinical development for cancer therapy). Because platinum compounds are widely used in the treatment of lung cancer, we tested the cytotoxicity of several combinations of cisplatin with the extract and found a moderate synergism when NOE was administered after cisplatin but a moderate antagonism when NOE was added before cisplatin. Our results suggest that extracts from *Nerium oleander* might induce anticancer effects in patients with lung cancer and support their possible advancement into Phase II clinical trials for the treatment of this type of cancer.

**Keywords:** cardiac glycosides, cardiotonic steroids, cardenolides, anticancer, lung cancer.



1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

# Introduction

Cardiac glycosides are a group of natural products that share a steroid-like structure with an unsaturated lactone ring and the ability to inhibit the  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase pump. The lactone moiety at position 17 defines the two classes of cardiac glycoside: cardenolides (with the lactone 2-furanone) and bufadienolides (with the lactone 2-pyrone). Numerous cardiac glycosides (e.g. digitoxin, digoxin, ouabain, oleandrin and proscillaridin) have been isolated from plants (e.g. *Digitalis purpurea*, *Digitalis lannata*, *Strophantus gratus*, *Nerium oleander*, and *Urginea maritima*). Some cardiac glycosides have also been found in amphibians and mammals, including digoxin, ouabain, bufalin, marinobufagenin and telecinobufagin. Some cardiac glycosides are used in cardiology for the treatment of cardiac congestion and some types of cardiac arrhythmias. The mechanism by which these drugs affect cardiac contractility is known to be mediated by a highly specific inhibition of  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase [1-3].

Over the years, there have been a variety of periodic reports suggesting that cardiac glycosides may have an anticancer utilization (reviewed in [4-8]). In vitro and ex-vivo experiments have revealed that some cardiac glycosides (e.g. digitoxin) induce selective anticancer effects [4,9,10], which may occur at concentrations commonly found in the plasma of patients treated with these drugs [11]. Some cardiac glycosides have also shown potent and selective anticancer effects in mice harboring human malignant cells [12,13]; however, these results should be interpreted cautiously, as mouse cells are much more resistant than human cells to the cytotoxic effects of cardiac glycosides, and it is not clear whether such selectivity is due to selective inhibition of tumor cells or to interspecies differences in sensitivity [14]. The cardiac drugs digitoxin and digoxin, the semi-synthetic cardiac glycoside UNBS1450, and two extracts from *Nerium oleander* have entered clinical trials for the treatment of cancer (see <http://clinicaltrials.gov/> and ref. [6,7,15,16]). Recently, however, Perne et al. reported results suggesting that cardiac glycosides-induced cytotoxicity was mediated by general protein synthesis inhibition and was not selective for cancer cells, raising concerns about ongoing clinical trials testing cardiac glycosides as anticancer agents [17]. Later, Hallbook et al. observed that some cardiac glycosides, particularly digitoxin, induced ex-vivo selective anticancer effects in leukemia cells, and found that protein synthesis inhibition by cardiac glycosides at concentrations corresponding to IC(50) values did not occur in all types of cancer cells [10]. These data suggest that cardiac glycosides may induce selective anticancer effects only in some types of cancer.

Several mechanisms of action have been proposed to participate in the cytotoxic activity of cardiac glycosides (reviewed in [5-8,16]). However, it is unclear why cancer cells are generally more susceptible than non-malignant cells to the cytotoxic activity of these compounds. Recent data have revealed that cancer cells have higher reliance on glycolysis for their survival than normal cells, and that the inhibition of glycolysis may cause selective anticancer effects [5,18,19]. In this communication, we have assessed the selective cytotoxic activity of a hydroalcoholic extract from the leaves of the cardenolide-containing plant *Nerium oleander* against A549 lung cancer cells vs. MRC5 non-malignant lung fibroblasts and have evaluated possible mechanisms involved in this activity. Results show that this extract induces selective killing of lung cancer cells and a marked inhibition of glycolysis.

## Material and Methods

### Plant material, preparation of the extract and determination of cardiac glycosides content

The leaves of *Nerium Oleander* L. (Apocynaceae) were collected in June 2010 in Seville (Spain; 37°22'16"N, 5° 59' 27"W). A voucher specimen (278048) was authenticated by Dr. F. Garcia and is deposited in the herbarium at the Department of Vegetal Biology and Ecology, Faculty of Biology, University of Seville. Fresh leaves of *Nerium Oleander* were extracted with ethanol:water (1:1) at 60°C for 1 hour by using an ultrasound water bath apparatus. Ethanol was eliminated in a rotary vacuum evaporator and the remaining water solution was lyophilized, with an extraction yield of 2.3%. The cardiac glycoside content of *Nerium oleander* was determined with the Kedde reaction, a colorimetric technique that allows the determination of unsaturated pentacyclic lactones (present in cardiac glycosides from *Nerium oleander*) by using 3,5-dinitrobenzoic acid [20]. Based on the standard 2-furanone (lactone of cardenolides), the percentage of cardenolides in the extract was determined, and was expressed as the mean  $\pm$  standard error of the means (SEM).

### Chemicals and cell lines

Cisplatin, dichloroacetate, *N*-acetylcysteine (NAC), and catalase were purchased from Sigma. The human A549 lung cancer cell line, the human embryo lung fibroblastic MRC-5 cell line, the human UACC-62 melanoma cell line, the human HT29 colon adenocarcinoma cell line, the homologous recombination (HR)-deficient VC8 cell line (V79 Chinese hamster lung cells mutated in BRCA2) and the VC8B2 cell line (VC8 cells complemented with human BRCA2) were maintained in DMEM supplemented with 2 mM glutamine, 50  $\mu$ g/mL penicillin, 50



1  
2  
3  $\mu\text{g/mL}$  streptomycin and 10% fetal bovine serum. All cell lines were cultured at 37°C in a  
4 humidified atmosphere containing 5% CO<sub>2</sub>. Cell culture reagents were obtained from Life  
5 Technologies.  
6

7  
8  
9  
10 **Assay for cytotoxic activity**

11  
12 The MTT assay is a colorimetric technique that allows the quantitative determination  
13 of cell viability. It is based on the capability of viable cells to transform the MTT salt (3-(4,5-  
14 dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) into a formazan dye. Exponentially  
15 growing cells were seeded into 96-well plates and drugs were added 24 h later. Following the  
16 incubation period specified in figure and table legends, medium was removed and 125  $\mu\text{L}$   
17 MTT (1 mg/mL in medium) was added to each well for 4 hours. Then, 80  $\mu\text{L}$  20% SDS in  
18 0.02 M HCl were added, plates were incubated for 10 hours at 37 °C, and optical densities  
19 were measured at 540 nm on a multiwell plate spectrophotometer reader. Cell viability was  
20 expressed as percentage in relation to controls. All data were averaged from at least three  
21 independent experiments and were expressed as means  $\pm$  standard error of the means (SEM).  
22  
23

24  
25  
26 **Immunofluorescence  $\gamma$ - H2AX focus assay**

27  
28 The immunofluorescence  $\gamma$ - H2AX focus assay is a sensitive technique to evaluate  
29 DNA damage. It is based on the ability of double-strand breaks (DSBs) to trigger  
30 phosphorylation of histone H2AX on Ser-139, which leads to the formation of nuclear foci  
31 that can be visualized with anti- $\gamma$ H2AX antibodies [21,22]. Cells were seeded on coverslips  
32 and allowed to attach for 24 hours. After treatments, cells were washed three times with PBS,  
33 fixed with 4% paraformaldehyde in PBS for 10 min at room temperature and washed three  
34 times with PBS. After fixation, cells were permeabilized with 0.5% Triton X-100 in PBS for  
35 5 minutes and then blocked three times with 0.1% Tween 20, 1% BSA in PBS for 5 minutes  
36 each. Cells were then incubated for 30 min with a mouse anti- $\gamma$ H2AX monoclonal antibody  
37 (Upstate, 1:1000 dilution). Cells were washed three times with PBS and blocked three times  
38 prior to the incubation with a secondary anti-mouse antibody linked to Alexa Fluor 488  
39 (Invitrogen, 1:1000 dilution) for 1 h. Cells were washed with PBS, blocked and washed again  
40 with PBS as indicated before. DNA was stained with DAPI and immunofluorescence was  
41 observed at 40-fold magnification with an Olympus BX 61 microscope. A total of ~200  
42 cells/dose were scored, and cells with 20 or more foci were scored as positive. Ionizing  
43 radiation was used as a positive control for the assay; cells were exposed to 4 Gy of ionizing  
44 radiation using an X-ray irradiator (Philips MU15F) operated at 100 KV and a dose rate of  
45 1Gy/min [23].  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54

55 **Inhibition of glycolysis**

56  
57 Glycolysis inhibition was assessed by measuring concentrations of glucose (initial  
58 product of glycolysis) and lactate (final product of glycolysis) in control and treated cells.  
59  
60

Briefly,  $10^6$  cells were exposed in 6-well plates to the tested compounds for 8 h, and glucose and lactate concentrations were determined in cell supernatants by using the Accutrend® Plus analyzer together with Accutrend glucose strips and BM-Lactate Strips (Roche Diagnostics). After calibrating the instrument with glucose and lactate calibration strips, test strips were used to determine glucose and lactate levels via colorimetric-oxidase mediator reactions according to the manufacturer's instructions [24]. Results are expressed as percentage of lactate production and percentage of glucose consumption in relation to untreated cells, and are shown as means  $\pm$  standard error of the means (SEM) of three independent experiments.

### Statistical analysis

All data were averaged from at least three independent experiments and were expressed as means  $\pm$  standard error of the means (SEM). For statistical analysis we used the t-test (paired, two-tailed). A P-value  $>0.05$  is not considered statistically significant and is not represented by any symbol. A P-value  $<0.05$  is considered to correspond with statistical significance and is indicated with an asterisk (\*), a P-value  $<0.01$  is indicated with a double asterisk (\*\*), and a P-value  $<0.001$  is indicated with a triple asterisk (\*\*\*).

## Results and Discussion

Extracts from the leaves of the cardiac glycoside-containing plant *Nerium oleander* L. (Apocynaceae) have shown anticancer effects in preclinical studies and have entered Phase I clinical trials [16,25,26]. Because recent data suggest that cardiac glycosides may induce selective anticancer effects only in some types of cancer cells [10,17], the aim of this work was to evaluate whether an extract from this plant induced selective cytotoxic activity in lung cancer cells and to evaluate possible mechanisms involved in this activity. A hydroalcoholic extract from the leaves of *N. Oleander* was prepared, and its content in cardiac glycosides (cardenolides) was determined to be  $4.75 \pm 0.32$  % with the Kedde reaction. A549 lung cancer cells and MRC5 non-malignant lung fibroblasts were exposed for 48 h to several concentrations of this *Nerium Oleander* extract (NOE) under the same experimental conditions and cell viability was estimated with the MTT assay. Results, represented in Figure 1, show that NOE exhibited selective cytotoxicity against the A549 cancer cell line, which was comparable to that of the anticancer drug cisplatin. The  $IC_{50}$  value (means  $\pm$  SEM) in this cancer cell line was approximately 10-fold lower for NOE ( $0.27 \pm 0.04$   $\mu\text{g/mL}$ ) than for cisplatin ( $11.67 \pm 3.54$   $\mu\text{M}$ ;  $3.51$   $\mu\text{g/mL}$ ). Several compounds were screened against these two cell lines and showed no selective cytotoxicity [27,28]. We have also prepared and assessed the cytotoxic activity of an extract of commercial broccoli under the same experimental conditions than used for NOE, and we did not observed selective cytotoxicity against the cancer cell line (data not shown). We also evaluated the cytotoxic activity of NOE in the human HT29 colon cancer cell line and in the human UACC62 melanoma cell line and observed that these cancer cells were more resistant than A549 lung cancer cells to the cytotoxicity of NOE; the  $IC_{50}$  values (means  $\pm$  SEM) were  $3.95 \pm 0.37$   $\mu\text{g/mL}$  in HT29 cells



and  $1.73 \pm 0.07 \mu\text{g/mL}$  in UACC62 cells. Overall, these data indicate that NOE inhibits the growth of A549 cancer cells potently and selectively.

Our next goal was to evaluate possible mechanisms involved in the selective cytotoxicity of NOE. We initially evaluated whether the formation of reactive oxygen species (ROS) played a role in the cytotoxicity of the extract. Accumulating data suggest that cancer cells have higher basal levels of ROS than non-malignant cells, and that the induction of a specific increase in ROS levels by pro-oxidant agents may lead to cytotoxic concentrations in cancer cells but not in normal cells. Indeed, oxidative stress has been shown to play an important role in the anticancer activity of several chemotherapeutic agents commonly used in cancer treatment [29-31] and in the cytotoxicity of many natural products [32], including that of the major constituent of *N. Oleander* oleandrin [33]. A549 cells were treated with NOE in the presence and absence of the antioxidants catalase and N-acetylcysteine, and cell viability was estimated with the MTT assay. Both antioxidants slightly but significantly prevented the cytotoxic activity of NOE (Figure 2), therefore suggesting that ROS formation participates the cytotoxicity of NOE but does not play a major role.

DNA-damaging compounds may induce selective cytotoxicity towards tumor cells. These cells commonly have mutations in DNA repair genes which make them vulnerable to the cytotoxic activity of specific DNA-damaging compounds. Unlike tumor cells, normal proliferating cells have an intact DNA damage response that would allow them to repair the DNA damage and therefore to survive treatment with these DNA-damaging compounds [34-36]. Because previous reports have shown that some cardiac glycosides induce DNA damage [11,37-39], we tested whether NOE induced DNA damage and if such damage participated in the cytotoxicity of the extract. We initially tested the cytotoxicity of NOE in cells with and without BRCA2 (a tumor suppressor gene which plays a critical role in DNA damage repair via the homologous recombination (HR) repair pathway). The HR-deficient VC8 cell line (V79 Chinese hamster lung cells mutated in BRCA2) and the VC8B2 cell line (VC8 cells complemented with human BRCA2) were exposed for 48 h to several concentrations of NOE and cell viability was then estimated with the MTT assay. Results, represented in figure 3A, show that the cytotoxic activity of NOE in cells lacking BRCA2 (deficient in HR repair) was slightly but significantly higher than that in parental cells, therefore suggesting that NOE can induce DNA damage and that NOE-induced DNA damage may play a role in its cytotoxicity. It is important to note that the cytotoxicity of NOE in these rodent cells was over 100-fold lower than that in human cells (Figure 1), as previously reported [40]. We next used the immunofluorescence  $\gamma$ -H2AX focus assay to directly measure the levels of DNA damage induced by NOE in both cell lines, and detected moderate levels DNA damage in cells exposed for 24 h to NOE  $320 \mu\text{g/mL}$  (Figure 3B). As expected, the levels of DNA damage in cells lacking BRCA2 (deficient in HR repair) were somewhat higher than those in parental cells. Taken as a whole, these data suggest that NOE induces DNA damage, and that this DNA damage participates in its cytotoxic activity but do not play a major role.

It has been known for some time that glycolysis is coupled to sodium and potassium transport processes, and that some cardiac glycosides (e.g., ouabain) can inhibit glycolysis in a variety of non-malignant cells [41,42]. It has recently been found that cancer cells are more



reliant on glycolysis for their survival than non-malignant cells (reviewed in [18,31]). Based on these findings, we previously proposed that cardiac glycosides might inhibit glycolysis in cancer cells and that such inhibition might play a critical role in the selective cytotoxicity of some cardiac glycosides (e.g. digitoxin) towards cancer cells [5]. To test if NOE could inhibit glycolysis, A549 cells were exposed to NOE for 8 h, and glucose and lactate concentrations were determined in cell supernatants. Results, represented in Figure 4, show that A549 cells exposed to NOE (1 and 10  $\mu\text{g/mL}$ ) exhibited a marked reduction in glucose consumption and lactate production, comparable to those observed in cells exposed to the glycolysis inhibitor dichloroacetate (DCA) 32 mM. No significant changes in glucose consumption and lactate production were observed in cells exposed to cisplatin 32  $\mu\text{M}$ . Figure 4C includes representative photographs of cells exposed for 8 h to NOE, DCA and cisplatin, where cell number and morphology can be appreciated. This figure seeks to show that the reduction in glucose consumption and lactate production induced by NOE is not caused by a reduction in cell number (fewer cells would consume less glucose and would produce less lactate). Knowing that glucose and lactate are, respectively, the initial and final products of glycolysis, our data indicate that NOE induces a marked inhibition of glycolysis in A549 lung cancer cells.

As mentioned before, cardiac glycosides are known to inhibit the  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase pump. Several mechanisms have been proposed to explain how the inhibition of this pump can lead to glycolysis inhibition [5]. Briefly, inhibition of the  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase pump would decrease glycolysis activity by inhibition of the key glycolytic enzyme phosphofructokinase (discussed in reference [5]). In addition, inhibition of the  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase pump may restrict the activity of sodium glucose transporters (SGLTs), which couple glucose entry into some types of cells to the activity of this pump [5]. Although these transporters are typically found in small intestine and renal epithelial cells, clinical data have revealed that these transporters (SGLT2) are overexpressed in lung cancer cells that have metastasized to other organs [43]. This suggests that SGLT2 plays a role in glucose uptake in the metastatic lesions of lung cancer, and that inhibition of the  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase pump by cardiac glycosides may inhibit glycolysis by reducing glucose entry into the cells. The inhibition of glycolysis induced by NOE in A549 lung cancer cells may therefore be caused by inhibition of the  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase pump, which would lead to both the inhibition of the glycolytic enzyme PFK and the inhibition of glucose entry into the cells.

Glycolysis inhibition is well known to produce cytotoxicity. The main cellular roles of glycolysis are to provide building blocks for biosynthesis and ATP, and evidence suggests that inhibition of these processes may have a higher impact in the viability of cancer cells than in that of non-malignant cells. Indeed, glycolysis inhibition has been proposed to be an anticancer strategy to selectively kill cancer cells [18,31]. Although here we report that NOE induces selective cytotoxicity against lung cancer cells and that this extract induces a marked inhibition of glycolysis, we cannot conclude that NOE-induced inhibition of glycolysis is responsible for its selective anticancer activity. Evidence suggests that the expression and cellular location of  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase alpha subunits in different types of cells (i.e., rodent cells, human cancer cells and human non-malignant cells) may explain why different cells are more

or less susceptible to the cytotoxic activity of cardiac glycosides [44-46]. The study of the possible association between the expression and cellular location of  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase alpha subunits and the ability of cardiac glycosides to inhibit glycolysis would help reveal whether the inhibition of glycolysis by these compounds plays a role in their selective cytotoxicity.

Since most cancer chemotherapy regimens include a combination of drugs, and since platinum compounds are widely used in the treatment of lung cancer, we assessed the cytotoxic activity of NOE in combination with cisplatin in A549 lung cancer cells. Then, we calculated the parameter Combination Index (CI) with the computer software Compusyn; this parameter is based on the Chou-Talalay method and offers quantitative definition for additive effect ( $\text{CI} = 1$ ), synergism ( $\text{CI} < 1$ ), and antagonism ( $\text{CI} > 1$ ) in drug combinations [47]. A549 cells were exposed for 44-48 h to several concentrations of cisplatin, NOE and cisplatin in combination with NOE. Cell viability was then estimated with the MTT assay. Results, collected in Table 1, revealed a moderate antagonism when NOE was added 4 h before cisplatin but a moderate synergism when NOE was administered 4 h after cisplatin. Evidence suggests that the  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase alpha1 subunit plays a role in the intracellular accumulation of cisplatin and that cardiac glycosides can reduce its intracellular accumulation [48]; this may explain the moderate antagonisms observed when cells were treated with NOE before cisplatin (Table 1). Administration of NOE after cisplatin might induce a moderate synergism by circumventing a variety of resistance pathways discussed elsewhere [16,49].

In conclusion, this work reports that an extract from the leaves of the cardiac glycoside-containing plant *Nerium oleander* L (NOE) exerts selective cytotoxic activity towards lung cancer cells, and induces a marked inhibition of glycolysis that may play a role in this activity. It also shows that NOE-induced DNA damage and ROS formation participate moderately in its cytotoxicity, and that the administration of NOE after the anticancer drug cisplatin may induce synergistic cytotoxicity. Since Phase I clinical trials have revealed that extracts from the leaves of *Nerium oleander* are well tolerated and may induce anticancer effects [16,25,26], the present results support their possible advancement into Phase II clinical trials for the treatment of lung cancer.

## References

- 1 *Rahimtoola SH, Tak T.* The use of digitalis in heart failure. *Curr Probl Cardiol* 1996; 21: 781-853.
- 2 *Xie Z, Askari A.*  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase as a signal transducer. *Eur J Biochem* 2002; 269: 2434-2439.
- 3 *Schoner W, Scheiner-Bobis G.* Endogenous and exogenous cardiac glycosides: their roles in hypertension, salt metabolism, and cell growth. *Am J Physiol Cell Physiol* 2007; 293: C509-C536.



- 4 *Haux J.* Digitoxin is a potential anticancer agent for several types of cancer. *Med Hypotheses* 1999; 53: 543-548.
- 5 *Lopez-Lazaro M.* Digitoxin as an anticancer agent with selectivity for cancer cells: possible mechanisms involved. *Expert Opin Ther Targets* 2007; 11: 1043-1053.
- 6 *Newman RA, Yang P, Pawlus AD, Block KI.* Cardiac glycosides as novel cancer therapeutic agents. *Mol Interv* 2008; 8: 36-49.
- 7 *Prassas I, Diamandis EP.* Novel therapeutic applications of cardiac glycosides. *Nat Rev Drug Discov* 2008; 7: 926-935.
- 8 *Mijatovic T, Van Quaquebeke E, Delest B, Debeir O, Darro F, Kiss R.* Cardiotonic steroids on the road to anti-cancer therapy. *Biochim Biophys Acta* 2007; 1776: 32-57.
- 9 *Sreenivasan Y, Raghavendra PB, Manna SK.* Oleandrin-mediated expression of Fas potentiates apoptosis in tumor cells. *J Clin Immunol* 2006; 26: 308-322.
- 10 *Hallbook H, Felth J, Eriksson A, Fryknas M, Bohlin L, Larsson R, Gullbo J.* Ex vivo activity of cardiac glycosides in acute leukaemia. *PLoS One* 2011; 6: e15718.
- 11 *Lopez-Lazaro M, Pastor N, Azrak SS, Ayuso MJ, Austin CA, Cortes F.* Digitoxin inhibits the growth of cancer cell lines at concentrations commonly found in cardiac patients. *J Nat Prod* 2005; 68: 1642-1645.
- 12 *Mijatovic T, Op DB, Van Quaquebeke E, Dewelle J, Darro F, de Launoit Y, Kiss R.* The cardenolide UNBS1450 is able to deactivate nuclear factor kappaB-mediated cytoprotective effects in human non-small cell lung cancer cells. *Mol Cancer Ther* 2006; 5: 391-399.
- 13 *Zhang H, Qian DZ, Tan YS, Lee K, Gao P, Ren YR, Rey S, Hammers H, Chang D, Pili R, Dang CV, Liu JO, Semenza GL.* Digoxin and other cardiac glycosides inhibit HIF-1alpha synthesis and block tumor growth. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; 105: 19579-19586.
- 14 *Lopez-Lazaro M.* Digoxin, HIF-1, and cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009; 106: E26.
- 15 *Rashan LJ, Franke K, Khine MM, Kelter G, Fiebig HH, Neumann J, Wessjohann LA.* Characterization of the anticancer properties of monoglycosidic cardenolides isolated from *Nerium oleander* and *Streptocaulon tomentosum*. *J Ethnopharmacol* 2011; 134: 781-788.
- 16 *Mijatovic T, Kiss R.* Cardiotonic Steroids-Mediated Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase Targeting Could Circumvent Various Chemoresistance Pathways. *Planta Med* 2013.
- 17 *Perne A, Muellner MK, Steinrueck M, Craig-Mueller N, Mayerhofer J, Schwarzingen I, Sloane M, Uras IZ, Hoermann G, Nijman SM, Mayerhofer M.* Cardiac glycosides induce cell death in human cells by inhibiting general protein synthesis. *PLoS One* 2009; 4: e8292.
- 18 *Pelicano H, Martin DS, Xu RH, Huang P.* Glycolysis inhibition for anticancer treatment. *Oncogene* 2006; 25: 4633-4646.

- 19 *Lopez-Lazaro M.* The Warburg effect: why and how do cancer cells activate glycolysis in the presence of oxygen? *Anticancer Agents Med Chem* 2008; 8: 305-312.
- 20 *Lopez-Lazaro M, Palma DLP, Pastor N, Martin-Cordero C, Navarro E, Cortes F, Ayuso MJ, Toro MV.* Anti-tumour activity of *Digitalis purpurea* L. subsp. *heywoodii*. *Planta Med* 2003; 69: 701-704.
- 21 *Watters GP, Smart DJ, Harvey JS, Austin CA.* H2AX phosphorylation as a genotoxicity endpoint. *Mutat Res* 2009; 679: 50-58.
- 22 *Lobrich M, Shibata A, Beucher A, Fisher A, Ensminger M, Goodarzi AA, Barton O, Jeggo PA.* gammaH2AX foci analysis for monitoring DNA double-strand break repair: strengths, limitations and optimization. *Cell Cycle* 2010; 9: 662-669.
- 23 *Pastor N, Pinero J, Ortiz T, Mateos JC, De Miguel M, Cortes F.* Topoisomerase activities and levels in irradiated Chinese hamster AA8 cells and in its radiosensitive mutant EM9. *Int J Radiat Biol* 1999; 75: 1035-1042.
- 24 *Cao X, Bloomston M, Zhang T, Frankel WL, Jia G, Wang B, Hall NC, Koch RM, Cheng H, Knopp MV, Sun D.* Synergistic antipancreatic tumor effect by simultaneously targeting hypoxic cancer cells with HSP90 inhibitor and glycolysis inhibitor. *Clin Cancer Res* 2008; 14: 1831-1839.
- 25 *Mekhail T, Kaur H, Ganapathi R, Budd GT, Elson P, Bukowski RM.* Phase 1 trial of Anvirez in patients with refractory solid tumors. *Invest New Drugs* 2006; 24: 423-427.
- 26 *Henary HA, Kurzrock R, Falchook GS, Naing A, Moulder SL, Wheeler JJ, Tsimberidou AM, Durand J, Yang P, Johansen MJ, Newman R, Khan R, Patel U, Hong DS.* Final results of a first-in-human phase I trial of PBI-05204, an inhibitor of AKT, FGF-2, NF-Kb, and p70S6K in advanced cancer patients. *ASCO Meeting Abstracts* 2011; 29: 3023.
- 27 *Lopez-Lazaro M, Calderon-Montano JM, Burgos-Moron E, Austin CA.* Green tea constituents (-)-epigallocatechin-3-gallate (EGCG) and gallic acid induce topoisomerase I- and topoisomerase II-DNA complexes in cells mediated by pyrogallol-induced hydrogen peroxide. *Mutagenesis* 2011; 26: 489-498.
- 28 *Vega-Perez JM, Palo-Nieto C, Perifan I, Vega-Holm M, Calderon-Montano JM, Lopez-Lazaro M, Iglesias-Guerra F.* Stereoselective Dihydroxylation Reaction of Alkenyl  $\beta$ -D-Hexopyranosides: A Methodology for the Synthesis of Glycosylglycerol Derivatives and 1-O-Acyl-3-O- $\beta$ -D-glycosyl-sn-glycerol Analogues. *Eur J Org Chem* 2012; 6: 1237-1252.
- 29 *Alexandre J, Batteux F, Nicco C, Chereau C, Laurent A, Guillevin L, Weill B, Goldwasser F.* Accumulation of hydrogen peroxide is an early and crucial step for paclitaxel-induced cancer cell death both in vitro and in vivo. *Int J Cancer* 2006; 119: 41-48.
- 30 *Lopez-Lazaro M.* Dual role of hydrogen peroxide in cancer: Possible relevance to cancer chemoprevention and therapy. *Cancer Lett* 2007; 252: 1-8.
- 31 *Lopez-Lazaro M.* A new view of carcinogenesis and an alternative approach to cancer therapy. *Mol Med* 2010; 16: 144-153.



- 32 *Martin-Cordero C, Leon-Gonzalez AJ, Calderon-Montano JM, Burgos-Moron E, Lopez-Lazaro M.* Pro-oxidant natural products as anticancer agents. *Curr Drug Targets* 2012; 13: 1006-1028.
- 33 *Newman RA, Yang P, Hittelman WN, Lu T, Ho DH, Ni D, Chan D, Vijjeswarapu M, Cartwright C, Dixon S, Felix E, Addington C.* Oleandrin-mediated oxidative stress in human melanoma cells. *J Exp Ther Oncol* 2006; 5: 167-181.
- 34 *Helleday T, Petermann E, Lundin C, Hodgson B, Sharma RA.* DNA repair pathways as targets for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 2008; 8: 193-204.
- 35 *Lord CJ, Ashworth A.* The DNA damage response and cancer therapy. *Nature* 2012; 481: 287-294.
- 36 *Postel-Vinay S, Vanhecke E, Olaussen KA, Lord CJ, Ashworth A, Soria JC.* The potential of exploiting DNA-repair defects for optimizing lung cancer treatment. *Nat Rev Clin Oncol* 2012; 9: 144-155.
- 37 *Bielawski K, Winnicka K, Bielawska A.* Inhibition of DNA topoisomerases I and II, and growth inhibition of breast cancer MCF-7 cells by ouabain, digoxin and proscillaridin A. *Biol Pharm Bull* 2006; 29: 1493-1497.
- 38 *Jomada LK, Valvassori SS, Arent CO, Leffa D, Damiani AA, Hainzenreder G, Ferreira CL, Moretti M, Andrade VM, Quevedo J.* DNA damage after intracerebroventricular injection of ouabain in rats. *Neurosci Lett* 2010; 471: 6-9.
- 39 *Hiyoshi H, Abdelhady S, Segerstrom L, Sveinbjornsson B, Nuriya M, Lundgren TK, Desfrere L, Miyakawa A, Yasui M, Kogner P, Johnsen JI, Andang M, Uhlen P.* Quiescence and gammaH2AX in neuroblastoma are regulated by ouabain/Na,K-ATPase. *Br J Cancer* 2012; 106: 1807-1815.
- 40 *Gupta RS, Chopra A, Stetsko DK.* Cellular basis for the species differences in sensitivity to cardiac glycosides (digitalis). *J Cell Physiol* 1986; 127: 197-206.
- 41 *Paul RJ, Bauer M, Pease W.* Vascular smooth muscle: aerobic glycolysis linked to sodium and potassium transport processes. *Science* 1979; 206: 1414-1416.
- 42 *James JH, Fang CH, Schrantz SJ, Hasselgren PO, Paul RJ, Fischer JE.* Linkage of aerobic glycolysis to sodium-potassium transport in rat skeletal muscle. Implications for increased muscle lactate production in sepsis. *J Clin Invest* 1996; 98: 2388-2397.
- 43 *Ishikawa N, Oguri T, Isobe T, Fujitaka K, Kohno N.* SGLT gene expression in primary lung cancers and their metastatic lesions. *Jpn J Cancer Res* 2001; 92: 874-879.
- 44 *Yang P, Menter DG, Cartwright C, Chan D, Dixon S, Suraokar M, Mendoza G, Llansa N, Newman RA.* Oleandrin-mediated inhibition of human tumor cell proliferation: importance of Na,K-ATPase alpha subunits as drug targets. *Mol Cancer Ther* 2009; 8: 2319-2328.
- 45 *Mijatovic T, Roland I, Van Quaquebeke E, Nilsson B, Mathieu A, Van Vynckt F, Darro F, Blanco G, Facchini V, Kiss R.* The alpha1 subunit of the sodium pump could represent a novel target to combat non-small cell lung cancers. *J Pathol* 2007; 212: 170-179.

- 1  
2  
3 46 Yang P, Cartwright C, Efuet E, Hamilton SR, Wistuba II, Menter D, Addington C,  
4 Shureiqi I, Newman RA. Cellular location and expression of Na(+), K(+) -ATPase  
5 alpha subunits affect the anti-proliferative activity of oleandrin. Mol Carcinog 2012 10.  
6  
7 47 Chou TC. Drug combination studies and their synergy quantification using the Chou-  
8 Talalay method. Cancer Res 2010; 70: 440-446.  
9  
10 48 Kishimoto S, Kawazoe Y, Ikeno M, Saitoh M, Nakano Y, Nishi Y, Fukushima S,  
11 Takeuchi Y. Role of Na+, K+-ATPase alpha1 subunit in the intracellular accumulation  
12 of cisplatin. Cancer Chemother Pharmacol 2006; 57: 84-90.  
13  
14 49 Mijatovic T, Dufrasne F, Kiss R. Cardiotonic steroids-mediated targeting of the  
15 Na(+)/K(+)-ATPase to combat chemoresistant cancers. Curr Med Chem 2012; 19:  
16 627-646.  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

For Peer Review

### Figure captions

**Figure 1.** A549 human lung cancer cells are more sensitive than MRC5 human non-malignant lung fibroblasts to the cytotoxic activity of *Nerium oleander* extract (NOE). A) Representative photographs of A549 and MRC5 cells cultured in 96-well plates for 48h in the absence (control) or presence of NOE (1 µg/ml) and cisplatin (32 µM). In B) and C), the percentage of cell viability (means ± SEM) in A549 and MRC5 cells exposed for 48 h to NOE (B) and the anticancer drug cisplatin (C) was determined with the MTT assay.

**Figure 2.** Catalase and N-acetylcysteine (NAC) slightly prevent the cytotoxic activity of NOE. A549 cells were exposed to NOE for 48 h in the absence or presence of the antioxidants catalase (A) and NAC (B). The antioxidants were added 0.5 h before NOE. Cell viability was assessed by the MTT assay.

**Figure 3.** Induction of DNA damage by NOE and role of homologous recombination (HR) in the repair of NOE-induced DNA damage. A) VC8 cells (mutated in BRCA2; deficient in HR repair) and VC8-B2 cells (VC8 cells complemented with BRCA2; HR proficient) were exposed to several concentrations of NOE for 48h and the percentage of cell viability (means ± SEM) was determined with the MTT assay. Representative photographs B) and quantification of nuclear foci C) in VC8 and VC8-B2 cells exposed for 4 h and 24 h to NOE 320 µg/mL.

**Figure 4.** NOE induces a marked inhibition of glycolysis in A549 cells. A) Percentage of lactate production and B) percentage of glucose consumption in A549 cells exposed for 8 h to NOE, dichloroacetate (DCA) and cisplatin in relation to untreated cells. C) Representative photographs of A549 cells exposed for 8h to NOE, dichloroacetate and cisplatin.



Table 1. Cytotoxic activity of NOE in combination with the anticancer drug cisplatin.

First compound added		Second compound added		Combination		
Concentration	% Cell viability	Concentration	% Cell viability	% Cell viability	CI	Effect
1 µM cisplatin	85,9 ± 2,3	32 ng/ml NOE	81,3 ± 2,9	80,1 ± 3,5	1,4	--
		100 ng/ml NOE	65,6 ± 0,3	58,7 ± 0,4	1,1	±
		320 ng/ml NOE	28,5 ± 4,0	24,7 ± 1,5	0,8	++
3 µM cisplatin	72,6 ± 2,8	32 ng/ml NOE	81,3 ± 2,9	64,8 ± 5,8	1,0	±
		100 ng/ml NOE	65,6 ± 0,3	50,9 ± 0,4	1,0	±
		320 ng/ml NOE	28,5 ± 4,0	22,6 ± 1,6	0,7	++
10 µM cisplatin	53,8 ± 0,2	32 ng/ml NOE	81,3 ± 2,9	49,8 ± 0,3	1,0	±
		100 ng/ml NOE	65,6 ± 0,3	37,15 ± 1,5	0,8	++
		320 ng/ml NOE	28,5 ± 4,0	21,24 ± 0,9	0,7	++
32 µM cisplatin	33,0 ± 2,6	32 ng/ml NOE	81,3 ± 2,9	31,23 ± 2,2	1,0	±
		100 ng/ml NOE	65,6 ± 0,3	24,2 ± 2,8	0,8	++
		320 ng/ml NOE	28,5 ± 4,0	13,8 ± 0,5	0,6	+++
32 ng/ml NOE	90,2 ± 2,2	1 µM cisplatin	86,0 ± 1,6	84,9 ± 3,9	1,2	-
100 ng/ml NOE	72,9 ± 5,1			64,3 ± 4,0	1,0	±
320 ng/ml NOE	24,6 ± 5,3			29,1 ± 3,9	1,1	±
32 ng/ml NOE	90,2 ± 2,2	3 µM cisplatin	84,7 ± 3,8	75,7 ± 1,3	1,2	-
100 ng/ml NOE	72,9 ± 5,1			63,0 ± 1,9	1,2	-
320 ng/ml NOE	24,6 ± 5,3			34,0 ± 3,6	1,3	--
32 ng/ml NOE	90,2 ± 2,2	10 µM cisplatin	59,8 ± 2,4	59,3 ± 3,6	1,1	±
100 ng/ml NOE	72,9 ± 5,1			52,4 ± 3,6	1,2	-
320 ng/ml NOE	24,6 ± 5,3			29,0 ± 0,1	1,2	-
32 ng/ml NOE	90,2 ± 2,2	32 µM cisplatin	40,7 ± 2,8	39,4 ± 0,9	1,0	±
100 ng/ml NOE	72,9 ± 5,1			36,7 ± 0,6	1,1	±
320 ng/ml NOE	24,6 ± 5,3			28,5 ± 0,9	1,5	---

A549 cancer cells were exposed for 44-48 h to several concentrations of NOE, cisplatin and NOE in combination with cisplatin (NOE was added 4 h before cisplatin or vice versa). Cell viability was assessed by the MTT assay. The parameter Combination Index (CI) was calculated with the computer software Compusyn. A CI value <1 is considered to be

1  
2  
3 synergism and is represented by “++++” for very strong synergism ( $CI < 0.1$ ), “++++” for  
4 strong synergism ( $CI = 0.1-0.3$ ), “+++” for synergism ( $CI = 0.3-0.7$ ), “++” for moderate  
5 synergism ( $CI = 0.7-0.85$ ) and “+” for slight synergism ( $CI = 0.85-0.9$ ). A CI value between 0.9  
6 and 1.1 corresponds with additive effect and is indicated with “±”. A CI value  $> 1$  is  
7 considered to be antagonism and is represented by “-” for slight antagonism ( $CI = 1.1-1.2$ ), “--”  
8 for moderated antagonism ( $CI = 1.2-1.45$ ), “---” for antagonism ( $CI = 1.45-3.3$ ), “----” for strong  
9 antagonism ( $CI = 3.3-10$ ) and “-----” for very strong antagonism ( $CI > 10$ ).  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

For Peer Review

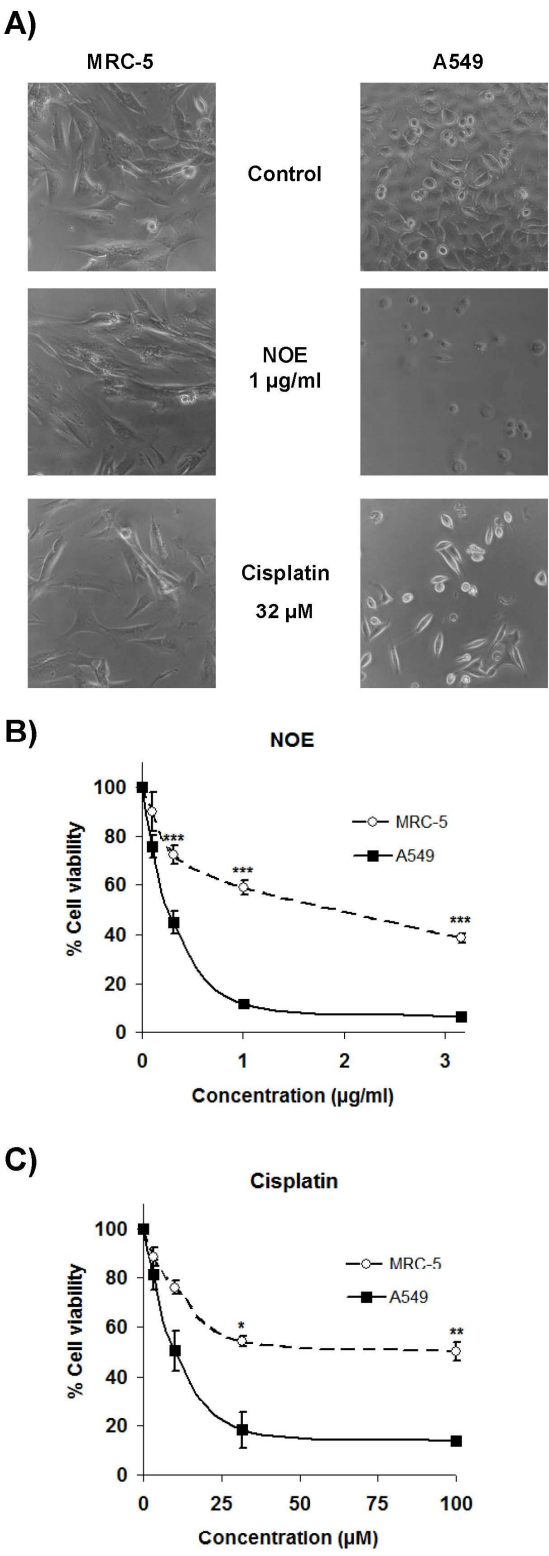


Figure 1

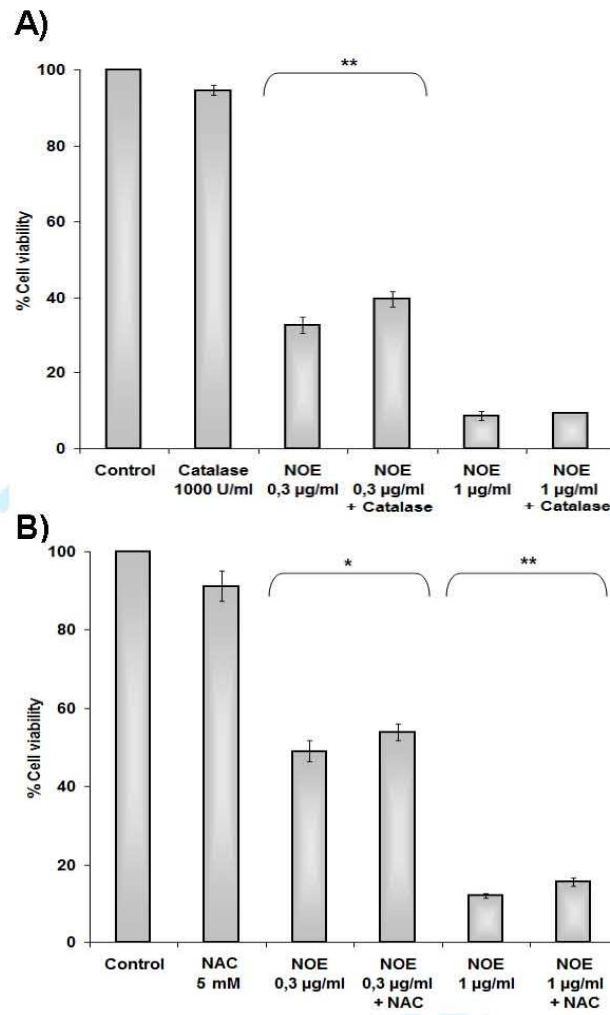


Figure 2



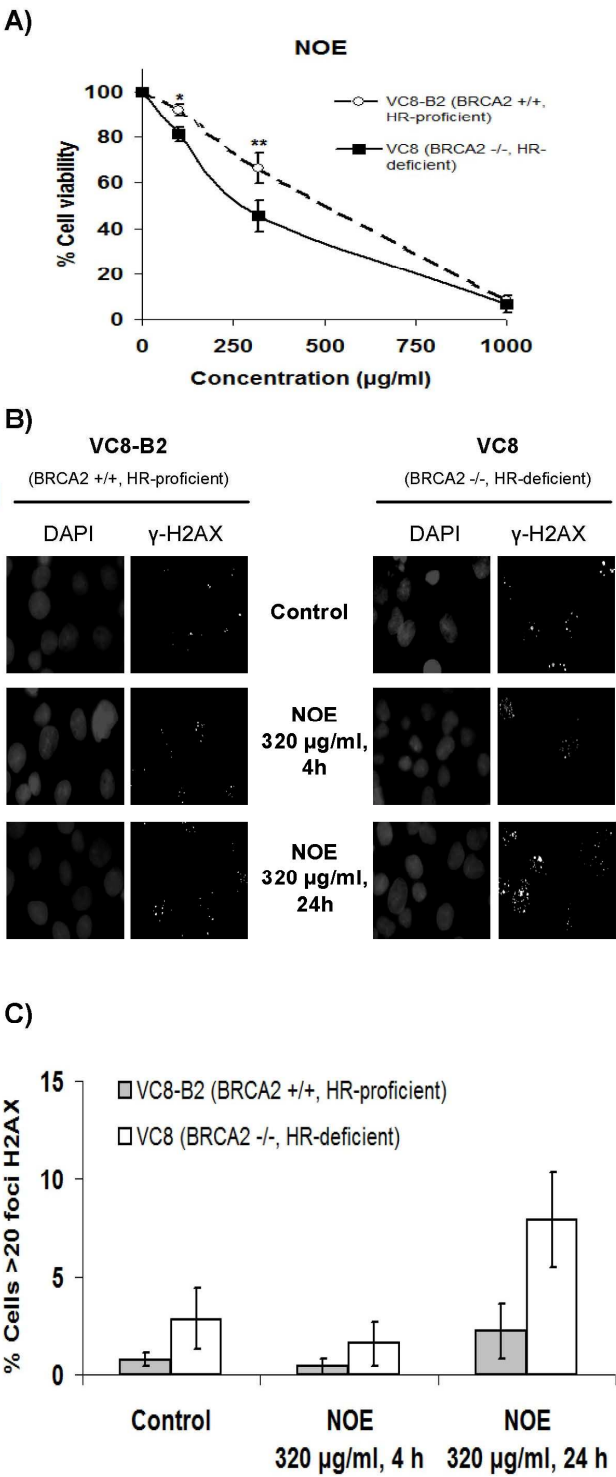


Figure 3

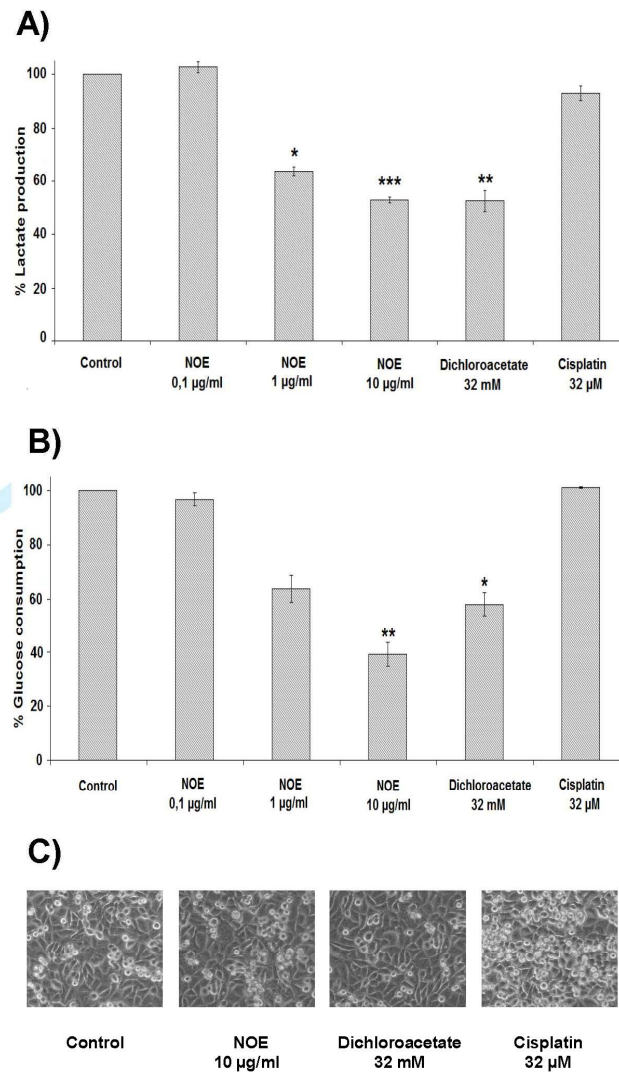


Figure 4

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 6.8. HETERÓSIDOS CARDIOTÓNICOS DIGITOXINA, DIGOXINA Y OUABAÍNA.

Los heterósidos cardiotónicos son compuestos esteroideos con un anillo de lactona que permite su clasificación en dos grandes grupos: cardenólidos y bufadienólidos. Los heterósidos cardiotónicos forman una gran familia de compuestos que presentes en una gran variedad de especies, tanto animales como vegetales. Los heterósidos cardiotónicos más conocidos son la digoxina, digitoxina, ouabaína y oleandrina. Desde hace siglos, plantas ricas en estos compuestos han sido utilizadas en el tratamiento de enfermedades cardíacas. En la actualidad, los digitoxina y digoxina son usadas en cardiología para el tratamiento de enfermedades cardíacas como la insuficiencia cardíaca congestiva y algunos tipos de arritmias<sup>153,154</sup>. Aunque digoxina ha desplazado a digitoxina debido a que presenta mejores propiedades terapéuticas, la digitoxina es todavía utilizada en algunos países como Noruega. La actividad inotrópica de estos fármacos se debe a su capacidad para inhibir a la bomba  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasa. La inhibición de esta bomba genera un aumento de los niveles de sodio y calcio y una disminución de los niveles de potasio intracelulares. El incremento intracelular de calcio promueve la contracción cardíaca.

En las últimas décadas, numerosos estudios han empezado a valorar a los heterósidos cardiotónicos como compuestos con posible actividad anticancerosa<sup>155-160</sup>. Esta actividad anticancerosa se ha observado a concentraciones equivalentes a las alcanzadas en el plasma de pacientes con tratamientos con algunos de estos compuestos<sup>156</sup>. Esto ha hecho que algunos heterósidos cardiotónicos, como la digoxina, digitoxina y la oleandrina, hayan entrado en ensayos clínicos para el tratamiento del cáncer (ver <http://clinicaltrials.gov/>). Sin embargo, existen estudios que indican que los heterósidos cardiotónicos podrían no ser selectivos por células cancerosas, afectando también a células normales. Perne y cols.<sup>161</sup> evaluaron la citotoxicidad de varios heterósidos cardiotónicos sobre un panel de líneas cancerosas y normales. Ellos no observaron que estos heterósidos cardiotónicos presentaran actividad citotóxica selectiva, afectando por igual a todos los tipos de células. Ellos explicaron que esta citotoxicidad fue debida a una inhibición de la síntesis proteica inducida por los heterósidos cardiotónicos en todas las líneas celulares ensayadas. Sin embargo, Hallbook y cols.<sup>162</sup> no observaron esta inhibición de la síntesis proteica en células de leucemia que demostraron ser sensibles a heterósidos cardiotónicos. Por otra parte, Joshi y cols. han demostrado que ouabaína y digoxina presentaron mayor actividad citotóxica frente a células de glioblastoma que frente a células normales<sup>163</sup>. Estos datos sugieren que los heterósidos cardiotónicos podrían poseer actividad anticancerosa selectiva dependiendo del tipo de tumor.

Para evaluar si los heterósidos cardiotónicos podían ser útiles en el tratamiento del cáncer de pulmón, durante esta tesis se evaluó la actividad de tres heterósidos cardiotónicos (digoxina, digitoxina y ouabaína) en un modelo *in vitro* de cáncer de pulmón (Figura 60).

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

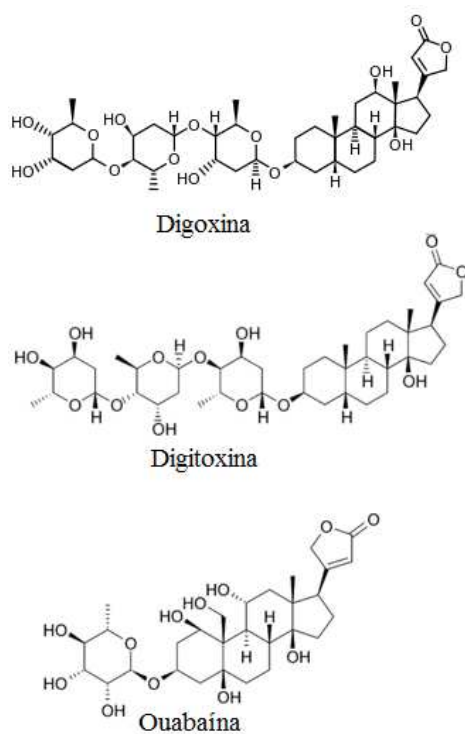


Figura 60. Estructura química de los digoxina, digitoxina y ouabaína.

6.8.1. *Digitoxina, digoxina y ouabaína tienen actividad anticancerosa selectiva frente células cancerosas de pulmón A549.*

Para evaluar la actividad anticancerosa de digitoxina, digoxina y ouabaína, células normales de pulmón MRC-5 y células de adenocarcinoma de pulmón A549 fueron expuestas a un rango de concentraciones de estos heterósidos durante 48 h. Transcurrido el tratamiento, se realizó el ensayo MTT para poder cuantificar la viabilidad celular. Los tres heterósidos cardiotónicos evaluados mostraron una gran selectividad sobre las células cancerosas (Figura 61).

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

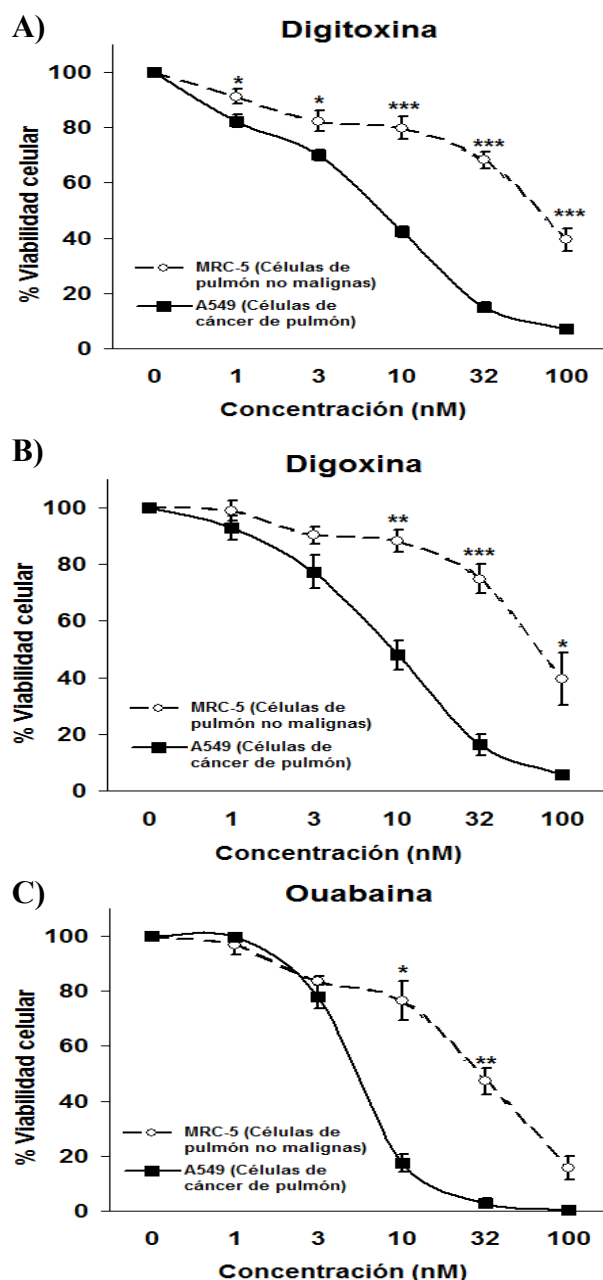


Figura 61. Los heterósidos cardiotónicos digitoxina, digoxina y ouabaína han demostrado actividad anticancerosa selectiva sobre células de cáncer de pulmón. Porcentaje de viabilidad celular de células A549 y células MRC-5 tras el tratamiento de 48 h con digitoxina (A), digoxina (B) y ouabaína (C).

Teniendo en cuenta los valores de IC<sub>50</sub> mostrados por los tres heterósidos sobre ambas líneas celulares (Tabla 14), ouabaína presentó la mayor actividad citotóxica sobre células A549, seguida por la digitoxina y por último la digoxina. Sin embargo, ouabaína también mostró la mayor actividad citotóxica sobre células MRC-5, siendo su IC<sub>50</sub> para estas células algo más de tres veces menor que las IC<sub>50</sub> mostradas por digitoxina y digoxina. A pesar de ello, ouabaína

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

demostró una mayor actividad citotóxica sobre células cancerosas que sobre células normales, siendo la IC50 para células A549 casi 6 veces menor que para las células normales. Teniendo en cuenta los valores de IC50 frente a ambas líneas celulares, digitoxina fue la que mayor actividad citotóxica selectiva presentó, siendo su IC50 para células A549 casi 10 veces menor que para las células normales. También es de destacar que la selectividad mostrada por digitoxina fue alcanzada a concentraciones que se pueden encontrar en los pacientes tratados con este fármaco. En estos pacientes, la concentración de digitoxina en plasma suele estar entre 19,6-32,6 nM<sup>156</sup>. En este intervalo de concentraciones se observó que la viabilidad celular de las células cancerosas A549 estuvo entre el 15-30%, por lo que quiere decir que la actividad anticancerosa selectiva de digitoxina podría llegar a alcanzarse en pacientes con cáncer de pulmón. Sin embargo, no se puede decir lo mismo de la digoxina, puesto que la concentración en plasma de pacientes tratadas con este fármaco suele estar entre 0,6-2 nM, mientras que la IC50 mostrada por digoxina frente a células A549 fue unas cinco veces mayor que este rango.

Por otro lado, esta actividad anticancerosa selectiva de los heterósidos cardiotónicos también fue observada cuando se realizó el ensayo de viabilidad celular SRB bajo las mismas condiciones que el ensayo MTT (datos no mostrados).

### *6.8.2. Evaluación de los posibles mecanismos de selectividad anticancerosa de los heterósidos cardiotónicos.*

Se ha hablado de numerosos mecanismos involucrados en la actividad anticancerosa de los heterósidos cardiotónicos, incluyendo la inhibición de factores de crecimiento (como el Factor Nuclear  $\kappa$ B o NF- $\kappa$ B), inhibición de topoisomerasas, la formación de ROS, la reducción de expresión de proteínas anti-apoptóticas, entre otros<sup>134,135,164</sup>. Pero se desconoce todavía el motivo por el que determinadas células cancerosas son más sensibles a estos compuestos. De hecho, se ha llegado a pensar que algunos de los mecanismos inducidos por estos heterósidos podrían no estar relacionados con su capacidad de inhibir la bomba Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPasa<sup>164</sup>.

Varios estudios han observado que heterósidos cardiotónicos, como oleandrina y ouabaína, pueden incrementar los niveles de EROs en células cancerosas, disminuyendo la proliferación e induciendo la muerte celular<sup>140,165</sup>. Como se ha discutido en otros apartados, se sabe que un incremento de los niveles de celulares de EROs puede inducir la muerte selectiva de células cancerosas<sup>33,36</sup>. Por este motivo, la generación de EROs que han demostrado algunos heterósidos cardiotónicos podría estar implicada en la actividad anticancerosa selectiva de estos compuestos. Para comprobar este posible mecanismo de selectividad, células A549 fueron expuestas durante 48 h a digoxina, digitoxina y ouabaína en presencia o ausencia de tres

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

antioxidantes (MnTMPyP, catalasa y NAC) que fueron añadidos una hora antes que los heterósidos cardiotónicos. Como se observa en la Figura 62, solamente ouabaina demostró que en su efecto citotóxico estaba involucrada la formación de EROs, concretamente  $H_2O_2$ , de forma significativa. Sin embargo, la formación de EROs no fue el principal mecanismo citotóxico de ouabaina, puesto que la citotoxicidad de ouabaina sólo se previno parcialmente por los antioxidantes. La citotoxicidad de digoxina también se vio disminuida en presencia de NAC, sin embargo, fue de manera no significativa. Estos datos quieren decir que aunque la generación de EROs podría participar en la actividad anticancerosa selectiva de los heterósidos cardiotónicos, no es el principal responsable de dicha selectividad.

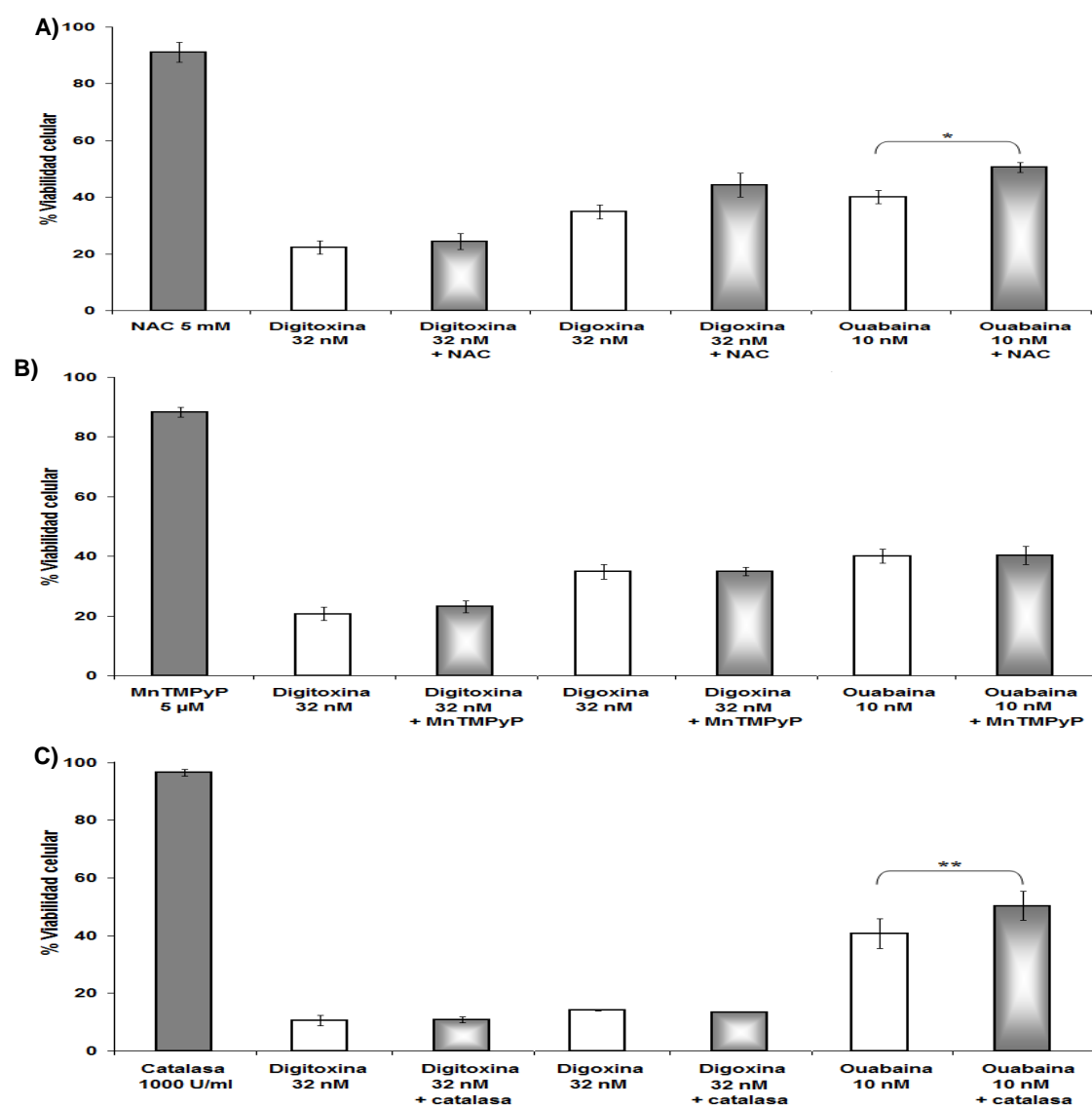


Figura 62. Papel de la generación de EROs en la citotoxicidad de heterósidos cardiotónicos. Células A549 fueron expuestas a los distintos heterósidos cardiotónicos durante 48 h en presencia o ausencia del antioxidante *n*-acetilcisteína (NAC) (A), del mimético superóxido dismutasa MnTMPyP (B) y de la enzima catalasa (C), los cuales fueron añadidos una hora antes a los heterósidos. La viabilidad celular fue medida mediante el ensayo MTT.



## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La activación constitutiva de la glicólisis aeróbica es una de las diferencias fundamentales entre las células normales y las células tumorales. Se piensa que la inhibición de la glicólisis puede llegar a producir la muerte selectiva de células cancerosas<sup>25,26,29</sup>. Desde hace años se sabe que la glicólisis aeróbica está asociada a la bomba  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasa y que heterósidos cardíacos, como la ouabaína, son capaces de inhibir la glicólisis<sup>147,148,166-168</sup>. Sin embargo, el mecanismo por el cual la inhibición de la actividad de la bomba  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasa puede inhibir la glicólisis no está claro todavía<sup>149</sup>. Se sabe que una de las enzimas claves en la regulación de la glicólisis es la fosfofructosaquinasa (PFK). Por un lado, se sabe que esta enzima es inhibida por elevados niveles de ATP. En el mantenimiento de los niveles de ATP, la bomba  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasa juega un papel fundamental. Cuando se produce la inhibición de esta bomba, se acumula ATP, pudiendo desencadenar la inhibición de la PFK y, por tanto, de la glicólisis. Por otro lado, la PFK es una enzima extremadamente sensible a los cambios de pH intracelulares. Se sabe que el incrementado pH intracelular demostrado por las células cancerosas permite mantener la PFK en un estado activo<sup>42</sup>. La inhibición de la bomba  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasa por los heterósidos cardiotónicos induce un cúmulo de  $\text{Na}^+$  en el interior de las células, reduciendo la actividad del intercambiador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ . Este intercambiador es uno de los responsables de mantener el pH básico intracelular que presentan las células cancerosas, por lo que su inhibición desencadenará una acidificación del pH intracelular, inactivándose la PFK y, por tanto, la glicólisis. Por otra parte, la glicólisis también depende de la disponibilidad de la glucosa. La glucosa entra en las células a través de una serie de transportadores. Un tipo de transportador de glucosa son los cotransportadores sodio/glucosa los cuales dependen de la regulación de los niveles de sodio para el transporte de glucosa al interior celular. El aumento de los niveles intracelulares de  $\text{Na}^+$  como consecuencia de la inhibición de la bomba  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasa puede inactivar a estos cotransportadores, disminuyendo la entrada de glucosa en la célula y, como consecuencia, inactivándose la glicólisis<sup>149</sup>. Todos estos posibles mecanismos explican la posibilidad de que la inhibición de la glicólisis sea una consecuencia de la inhibición de la bomba  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasa por los heterósidos cardiotónicos y que esta inhibición de la glicólisis podría explicar la actividad anticancerosa selectiva presentada por estos compuestos (Figura 63).

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

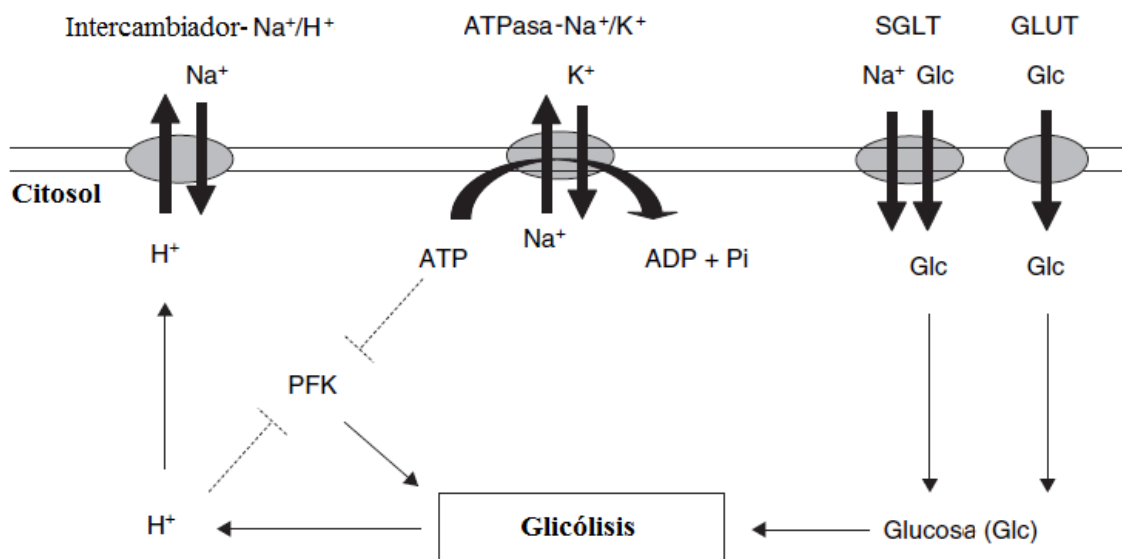


Figura 63. Posible mecanismo del papel de la bomba  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasa en la activación de la glicólisis. Las células necesitan la bomba  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasa para poder mantener activa la glicólisis. Una inhibición de la bomba  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasa por los heterósidos cardiotónicos podría provocar la reducción de la actividad del cotransportador glucosa/ $\text{Na}^+$  (SGLT), la disminución de la actividad del intercambiador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  y la inactivación de la enzima glicolítica fosfofructoquinasa (PFK). Figura adaptada del artículo “López-Lázaro, M. Digitoxin as an anticancer agent with selectivity for cancer cells: possible mechanisms involved. *Expert. Opin. Ther. Targets*. 2007. 11 (8): 1043-1053”<sup>149</sup>.

Para comprobar si los heterósidos cardiotónicos pueden inhibir la glicólisis, células A549 fueron tratadas con varias concentraciones de digitoxina, digoxina y ouabaina durante un tiempo de exposición de 8 h. Transcurrido el tiempo de tratamiento, se midieron las concentraciones de glucosa (producto de partida de la glicólisis) y de lactato (producto final de la glicólisis) presentes en el medio de las células. El tiempo de exposición escogido fue de 8 h puesto que un tiempo mayor de exposición con heterósidos cardiotónicos disminuiría la viabilidad celular, interfiriendo en los resultados (a menor viabilidad celular, menor producción de lactato y menor consumo de glucosa). Los resultados obtenidos con los tres heterósidos están recogidos en la Figura 64.

Los tres heterósidos disminuyeron la producción de lactato y el consumo de glucosa de manera concentración-dependiente. Digitoxina disminuyó de manera más significativa los niveles de lactato producido y de glucosa consumida que digoxina a las mismas concentraciones testadas. A la concentración de 100 nM, Digitoxina disminuyó de forma estadísticamente significativa la producción de lactato hasta casi la mitad respecto a las células no tratadas. Este mismo efecto se observó en los niveles de glucosa, las células tratadas con digitoxina

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

consumieron el 50% menos de glucosa que las células sin tratar. Ouabaina fue el heterósido más potente de los tres, produciendo los mismos efectos sobre los niveles de lactato y glucosa a concentraciones 10 veces más bajas que digitoxina y digoxina. Estos datos demuestran que estos heterósidos cardiotónicos inhiben la glicólisis y se sabe que la inhibición de ésta produce citotoxicidad, al ser una ruta necesaria para la producción de ATP y macromoléculas para la biosíntesis. Sin embargo, no se sabe si esta inhibición de la glicólisis es la responsable de la selectividad de estos heterósidos cardiotónicos frente a células cancerosas A549.

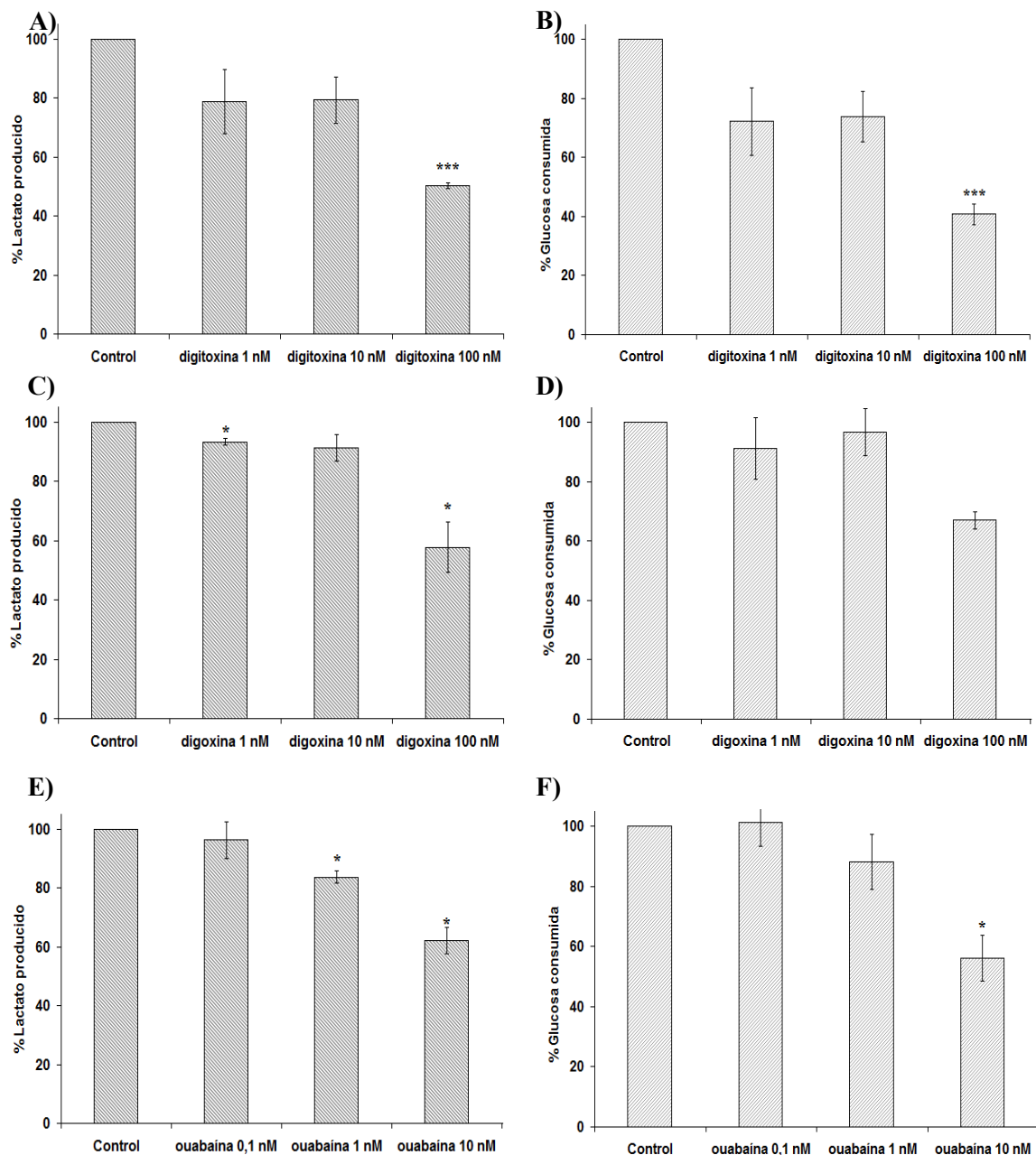


Figura 64. Heterósidos cardiotónicos inhiben la glicólisis en células A549. Porcentaje de producción de lactato (A, C y E) y porcentaje de consumo de glucosa (B, D y F) en células A549 expuestas 8 h a digitoxina, digoxina y ouabaina, respectivamente, con respecto a células no tratadas.

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Con el objetivo de evaluar si esta inhibición de la glicólisis por los heterósidos cardiotónicos participaba en su actividad citotóxica selectiva, se midieron los niveles de glucosa y lactato tras el tratamiento con digitoxina durante 8 h de células normales MRC-5 y células cancerosas A549 (Figura 65). Se escogió digitoxina porque, como se comentó anteriormente, fue el heterósido con mayor actividad selectiva.

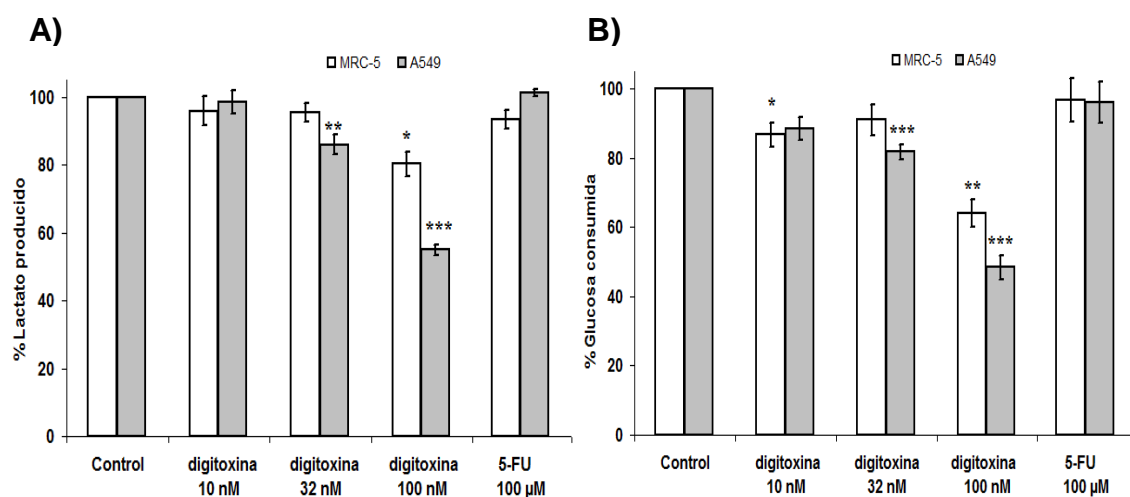


Figura 65. Heterósidos cardiotónicos inhiben la glicólisis de células MRC-5 y células A549. Porcentaje de producción de lactato (A) y porcentaje de consumo de glucosa (B) en células MRC-5 y A549 expuestas 8 h a digitoxina y 5-FU (control negativo) con respecto a células no tratadas

Digitoxina disminuyó de forma más acusada la producción de lactato y el consumo de glucosa en células cancerosas A549 que en células normales MRC-5 a las concentraciones de 32 y 100 nM tras un tiempo de exposición de 8 h. A la concentración de 100 nM, digitoxina disminuyó la producción de lactato en A549 hasta casi el 50% con respecto a las células sin tratar, mientras que la disminución en células MRC-5 fue de aproximadamente un 20% con respecto a las células sin tratar. Sin embargo, a pesar de que estos resultados demuestran que estos heterósidos son capaces de inhibir la glicólisis, no se puede asegurar que esta inhibición sea la responsable directa de la actividad anticancerosa selectiva de estos compuestos. De hecho, existen estudios que sugieren que la expresión y la localización celular de las subunidades alfas de la bomba  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasa en diferentes tipos de células podría explicar el por qué diferentes células son más o menos sensibles a la actividad citotóxica de heterósidos cardiotónicos<sup>150,151</sup>. Mijatovic y cols.<sup>150</sup> observaron que varias células cancerosas de pulmón presentaron mayores niveles de expresión de la bomba  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasa, en concreto subunidad

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

$\alpha 1$ , que células normales de pulmón. Ellos observaron que un nuevo cardenólido, el UNBS1450, presentó mayor actividad citotóxica sobre células cancerosas que sobre células normales, posiblemente debido a la mayor expresión de la ATPasa diana en las células cancerosas. Por tanto, es necesario realizar un estudio de la relación entre la expresión y la localización celular de las subunidades alfa de la bomba  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasa y la capacidad de los heterósidos cardiotónicos para inhibir la glicólisis para poder comprobar si la inhibición de la glicólisis por estos compuestos realmente juega un papel en su actividad anticancerosa selectiva.

### 6.8.3. Estudio de la combinación de digitoxina con agentes prooxidantes.

Aunque no esté claro el papel de la inhibición de la glicólisis en la actividad selectiva de estos heterósidos cardiotónicos, sí que se sabe que esta inhibición contribuye a su efecto citotóxico, puesto que es conocida la importancia de la glicólisis para el mantenimiento de los niveles de ATP y de macromoléculas requeridas para la proliferación y viabilidad de las células cancerosas. Otro papel fundamental de la glicólisis es ayudar a mantener las EROs dentro de niveles no tóxicos para las células cancerosas, por lo que la inhibición de la glicólisis hace a las células cancerosas más susceptibles al estrés oxidativo. Por este motivo, se piensa que la combinación de inhibidores de glicólisis con agentes prooxidantes podría presentar un efecto sinérgico de la citotoxicidad de estos compuestos<sup>25</sup>. Como se ha comentado anteriormente, los heterósidos cardiotónicos aquí evaluados son capaces de inhibir la glicólisis. Para comprobar si podría existir sinergismo entre estos heterósidos cardiotónicos como inhibidores de glicólisis y agentes prooxidantes, se estudió la combinación de digitoxina (el heterósido cardiotónico con mayor actividad selectiva de los aquí ensayados) con varios de los agentes prooxidantes estudiados en esta tesis (pirogalol, fenilglioxal y vitamina C). Con este objetivo, células normales MRC-5 y células cancerosas A549 fueron tratadas durante 8 h con diferentes concentraciones de digitoxina y estos prooxidantes solos o en combinación. Después de las 8 h, el tratamiento fue retirado y las células fueron incubadas libres de tratamiento durante 40 h. Finalizado el tiempo de incubación, la viabilidad celular fue estimada mediante ensayo MTT y el efecto combinatorio fue expresado mediante el parámetro de Índice de Combinación (CI), el cual fue calculado con el software CompuSyn. El parámetro CI, basado en el método de Chou-Talalay, permite dar un valor al efecto combinatorio de dos fármacos, estableciéndose como un efecto aditivo cuando el valor es 1, sinergismo cuando el valor es  $< 1$ , y antagonismo cuando el valor es  $> 1$ <sup>59</sup>. Los resultados que se obtuvieron son recogidos en la Tabla 9. De forma general se puede decir que la combinación de los prooxidantes fenilglioxal, pirogalol y vitamina C con digitoxina presentó un efecto sinérgico sobre células cancerosas mientras que presentó un ligero efecto antagónico sobre células normales. En otras palabras, la combinación de digitoxina con un agente prooxidante mató de forma más selectiva células cancerosas que células normales.

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Estos datos sugieren que la inhibición de la glicólisis inducida por digitoxina puede provocar un aumento de la sensibilidad de las células al aporte exógeno de EROs por agentes prooxidantes, potenciando la actividad anticancerosa selectiva mostrada por estos compuestos.

Célula	Digitoxina		Prooxidante			Combinación	CI	Efecto
	Conc.	% Viab. Celular	Compuesto	Conc.	% Viab. Celular	% Viab. Celular		
MRC-5	32 nM	100,3 ± 3,4	Vitamina C	300 µM	102,7 ± 5,4	96,1 ± 5,4	0,9	±
				500 µM	83,9 ± 3,8	62,9 ± 14,3	1,2	-
			Pirogalol	32 µM	67,6 ± 8,8	72,2 ± 7,5	1,7	---
				50 µM	63,3 ± 6,4	66,5 ± 7,4	1,5	---
	100 nM	100,8 ± 4,3	Fenilglioxal	100 µM	92,6 ± 5,6	92,1 ± 3,6	2,3	---
			Vitamina C	300 µM	102,7 ± 5,4	94,5 ± 4,7	1,5	---
				500 µM	83,9 ± 3,8	70,5 ± 8,3	1,7	---
			Pirogalol	32 µM	67,6 ± 8,8	67,1 ± 8,6	1,6	---
A549	32 nM	86,6 ± 5,6	Pirogalol	50 µM	63,3 ± 6,4	61,4 ± 9,9	1,6	---
				100 µM	92,6 ± 5,6	69,1 ± 8,1	>10	-----
			Fenilglioxal	300 µM	95,3 ± 4,8	80,2 ± 1,5	1,4	--
				500 µM	39,4 ± 12,5	44,25 ± 7	1,2	-
	100 nM	65,4 ± 5,7	Pirogalol	32 µM	37,8 ± 5,3	30,2 ± 6,9	0,7	++
				50 µM	31 ± 5,3	22,5 ± 4,7	0,6	+++
			Fenilglioxal	100 µM	81,9 ± 1,2	66,2 ± 2,4	0,7	+++
				300 µM	95,3 ± 4,8	55,2 ± 3,2	1,4	--
			Pirogalol	500 µM	39,4 ± 12,5	18,6 ± 5,8	1,0	±
				32 µM	37,8 ± 5,3	17,8 ± 3,9	0,4	+++
			Fenilglioxal	50 µM	31 ± 5,3	11,9 ± 3,3	0,3	+++
				100 µM	81,9 ± 1,2	43,7 ± 5,0	0,6	+++

Tabla 9. Actividad citotóxica de digitoxina en combinación con varios agentes prooxidantes. Las células cancerosas A549 y las células normales MRC-5 fueron expuestas 8 h a los heterósidos cardiotónicos, solos o en combinación con alguno de los agentes prooxidantes. Tras ese tiempo, se retiró el tratamiento y las células fueron incubadas 40 h más. El porcentaje de viabilidad celular (media ± SEM) fue determinada mediante ensayo MTT y el parámetro de Índice de Combinación (CI) fue calculado con el software Compusyn. Un valor de CI <1 es considerado sinergismo y se representa con “++++” para sinergismo muy fuerte (CI<0.1), “++++” para sinergismo fuerte (CI=0.1-0.3), “+++” para sinergismo (CI=0.3-0.7), “++” para sinergismo moderado (CI=0.7-0.85) y “+” para sinergismo ligero (CI=0.85-0.9). Un valor de CI entre 0.9 y 1.1 se considera efecto aditivo y es indicado con “±”. Un valor de CI >1 es considerado antagonismo y es representado por “-” para antagonismo ligero (CI=1.1-1.2), “--” para antagonismo moderado (CI=1.2-1.45), “---” para antagonismo (CI=1.45-3.3), “----” para antagonismo fuerte (CI=3.3-10) y “-----” para antagonismo muy fuerte (CI>10).

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 6.8.4. Evaluación del efecto combinatorio de heterósidos cardiotónicos y cisplatino.

Anteriormente se comentó que algunos heterósidos cardiotónicos, como digitoxina y digoxina, han entrado en ensayos clínicos para el tratamiento del cáncer. Muchos de estos ensayos estudian la combinación de un heterósido cardiotónico con algún fármaco anticanceroso utilizado en clínica, puesto que el tratamiento combinado de fármacos es una herramienta muy utilizada en el tratamiento del cáncer. Existen estudios que sugieren que los heterósidos cardiotónicos podrían ejercer un efecto antagónico sobre el efecto de determinados fármacos anticancerosos<sup>144,152</sup>. Por este motivo, se decidió evaluar el efecto de la combinación de los heterósidos cardiotónicos aquí ensayados con cisplatino, el fármaco anticanceroso más utilizado en el tratamiento del cáncer de pulmón. Para ello, células cancerosas A549 fueron expuestas durante 4 horas a cisplatino o a los heterósidos cardiotónicos. Transcurrido ese tiempo, se añadieron los heterósidos cardiotónicos o el cisplatino, en función del tratamiento inicial. Después de un tratamiento en combinación de 44 horas, la viabilidad de las células fue medida con el ensayo MTT. Los datos obtenidos se encuentran en las Tablas 10-13.

A concentraciones bajas de cisplatino (1 y 3  $\mu\text{M}$ ), el efecto general de las combinaciones fue aditivo, sin importar si cisplatino se añadiese antes o después que los heterósidos cardiotónicos (Tabla 13). Sin embargo, a mayores concentraciones de cisplatino (10 y 32  $\mu\text{M}$ ), el efecto de las combinaciones se vio influenciado por el orden del tratamiento. Cuando cisplatino fue añadido 4 h previamente al tratamiento con los heterósidos cardiotónicos, el efecto de la combinación fue un moderado sinergismo, a excepción de ouabaína que continuó siendo un efecto aditivo. Pero cuando los heterósidos cardiotónicos fueron añadidos 4 h previamente al tratamiento con cisplatino, el efecto de la combinación continuó siendo aditivo o, en el caso de la ouabaína, fue incluso antagónico. Estas diferencias del efecto combinatorio dependiendo del orden del tratamiento podría explicarse porque se ha visto que la bomba  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasa puede jugar un papel en la acumulación intracelular de cisplatino. La inhibición de esta bomba ha sido asociada con una reducción de la acumulación intracelular de cisplatino<sup>152</sup>. Esto podría explicar que la administración de estos heterósidos cardiotónicos antes que cisplatino presentara un efecto combinatorio entre aditivo y un ligero antagonismo, mientras que la administración de estos heterósidos después de cisplatino presentara un efecto sinérgico.



## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Primer compuesto añadido		Segundo compuesto añadido		Combinación		
<i>Conc.</i>	% Viab. Celular	<i>Conc.</i>	% Viab. Celular	% Viab. Celular	CI	Efecto
1 $\mu$ M cisplatino	85,9 $\pm$ 2,3	1 nM digitoxina	83,7 $\pm$ 2,8	76,9 $\pm$ 1,6	1,1	$\pm$
		3 nM digitoxina	66,2 $\pm$ 2,7	63,4 $\pm$ 1,1	1,1	$\pm$
		10 nM digitoxina	32,1 $\pm$ 1,3	29,9 $\pm$ 4,2	0,9	+
3 $\mu$ M cisplatino	72,6 $\pm$ 2,8	1 nM digitoxina	83,7 $\pm$ 2,8	64,5 $\pm$ 0,1	0,9	+
		3 nM digitoxina	66,2 $\pm$ 2,7	56,8 $\pm$ 1,2	1,1	$\pm$
		10 nM digitoxina	32,1 $\pm$ 1,3	30,7 $\pm$ 3,4	1,0	$\pm$
10 $\mu$ M cisplatino	53,8 $\pm$ 0,2	1 nM digitoxina	83,7 $\pm$ 2,8	45,7 $\pm$ 2,2	0,8	++
		3 nM digitoxina	66,2 $\pm$ 2,7	36,7 $\pm$ 2,1	0,7	++
		10 nM digitoxina	32,1 $\pm$ 1,3	23,6 $\pm$ 3,5	0,8	++
32 $\mu$ M cisplatino	33,0 $\pm$ 2,6	1 nM digitoxina	83,7 $\pm$ 2,8	31,1 $\pm$ 0,1	1,0	$\pm$
		3 nM digitoxina	66,2 $\pm$ 2,7	25,8 $\pm$ 0,0	0,8	++
		10 nM digitoxina	32,1 $\pm$ 1,3	16,84 $\pm$ 0,2	0,7	++
1 nM digitoxina	83,0 $\pm$ 1,5	1 $\mu$ M cisplatino	96,3 $\pm$ 2,6	83,3 $\pm$ 1,9	1,2	-
3 nM digitoxina	63,0 $\pm$ 2,7			63,1 $\pm$ 1,0	1,2	-
10 nM digitoxina	23,9 $\pm$ 0,7			23,9 $\pm$ 2,3	1,0	$\pm$
1 nM digitoxina	83,0 $\pm$ 1,5	3 $\mu$ M cisplatino	84,7 $\pm$ 3,8	69,2 $\pm$ 3,1	0,8	++
3 nM digitoxina	63,0 $\pm$ 2,7			57,5 $\pm$ 7,2	1,2	-
10 nM digitoxina	23,9 $\pm$ 0,7			14,2 $\pm$ 0,1	0,6	+++
1 nM digitoxina	83,0 $\pm$ 1,5	10 $\mu$ M cisplatino	59,8 $\pm$ 2,4	57,1 $\pm$ 1,0	1,0	$\pm$
3 nM digitoxina	63,0 $\pm$ 2,7			45,6 $\pm$ 1,4	1,1	$\pm$
10 nM digitoxina	23,9 $\pm$ 0,7			13,2 $\pm$ 3,0	0,6	+++
1 nM digitoxina	83,0 $\pm$ 1,5	32 $\mu$ M cisplatino	40,7 $\pm$ 2,8	35,0 $\pm$ 0,7	1,1	$\pm$
3 nM digitoxina	63,0 $\pm$ 2,7			30,8 $\pm$ 1,5	1,2	-
10 nM digitoxina	23,9 $\pm$ 0,7			15,7 $\pm$ 0,6	1,0	$\pm$

Tabla 10. Actividad citotóxica de digitoxina en combinación con cisplatino dependiendo del orden del tratamiento. Células cancerosas A549 fueron expuestas durante 4 horas a cisplatino o a digitoxina. Después de este tiempo, se añadió digitoxina o cisplatino, en función del tratamiento inicial. Después de un tratamiento en combinación de 40 horas, la viabilidad de las células fue medida con el ensayo MTT y el parámetro de Índice de Combinación (CI) fue calculado con el software Compusyn. Ver Tabla 9 para el significado de los símbolos que representan el efecto de la combinación.

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Primer compuesto añadido		Segundo compuesto añadido		Combinación		
Conc.	% Viab. Celular	Conc.	% Viab. Celular	% Viab. Celular	CI	Efecto
1 $\mu$ M cisplatino	85,9 $\pm$ 2,3	1 nM digoxina	88,8 $\pm$ 2,6	87,3 $\pm$ 2,6	1,9	---
		3 nM digoxina	75,6 $\pm$ 4,8	78,4 $\pm$ 9,2	1,7	---
		10 nM digoxina	45,1 $\pm$ 3,9	46,0 $\pm$ 5,9	1,1	$\pm$
3 $\mu$ M cisplatino	72,6 $\pm$ 2,8	1 nM digoxina	88,8 $\pm$ 2,6	72,2 $\pm$ 1,9	1,2	-
		3 nM digoxina	75,6 $\pm$ 4,8	61,7 $\pm$ 1,1	1,1	$\pm$
		10 nM digoxina	45,1 $\pm$ 3,9	41,1 $\pm$ 1,3	1,0	$\pm$
10 $\mu$ M cisplatino	53,8 $\pm$ 0,2	1 nM digoxina	88,8 $\pm$ 2,6	52,2 $\pm$ 0,2	1,0	$\pm$
		3 nM digoxina	75,6 $\pm$ 4,8	45,0 $\pm$ 0,8	0,9	$\pm$
		10 nM digoxina	45,1 $\pm$ 3,9	35,1 $\pm$ 0,7	1,0	$\pm$
32 $\mu$ M cisplatino	33,0 $\pm$ 2,6	1 nM digoxina	88,8 $\pm$ 2,6	28,7 $\pm$ 0,2	0,3	+++
		3 nM digoxina	75,6 $\pm$ 4,8	29,5 $\pm$ 0,0	0,4	+++
		10 nM digoxina	45,1 $\pm$ 3,9	21,4 $\pm$ 0,1	0,4	+++
1 nM digoxina	91,8 $\pm$ 2,8	1 $\mu$ M cisplatino	96,3 $\pm$ 2,6	91,2 $\pm$ 0,0	1,4	--
3 nM digoxina	79,9 $\pm$ 1,2			70,23 $\pm$ 0,1	0,7	++
10 nM digoxina	51,8 $\pm$ 7,8			45,41 $\pm$ 0,2	0,8	++
1 nM digoxina	91,8 $\pm$ 2,8	3 $\mu$ M cisplatino	84,7 $\pm$ 3,8	76,3 $\pm$ 1,8	0,8	++
3 nM digoxina	79,9 $\pm$ 1,2			60,8 $\pm$ 0,9	0,7	++
10 nM digoxina	51,8 $\pm$ 7,8			50,4 $\pm$ 4,8	1,1	$\pm$
1 nM digoxina	91,8 $\pm$ 2,8	10 $\mu$ M cisplatino	59,8 $\pm$ 2,4	58,2 $\pm$ 1,0	0,9	+
3 nM digoxina	79,9 $\pm$ 1,2			47,1 $\pm$ 0,2	0,7	++
10 nM digoxina	51,8 $\pm$ 7,8			41,7 $\pm$ 6,7	1,1	$\pm$
1 nM digoxina	91,8 $\pm$ 2,8	32 $\mu$ M cisplatino	40,7 $\pm$ 2,8	36,1 $\pm$ 2,5	1,0	$\pm$
3 nM digoxina	79,9 $\pm$ 1,2			36,6 $\pm$ 1,1	1,2	-
10 nM digoxina	51,8 $\pm$ 7,8			26,1 $\pm$ 1,4	1,0	$\pm$

Tabla 11. Actividad citotóxica de digoxina en combinación con cisplatino dependiendo del orden del tratamiento. Células cancerosas A549 fueron expuestas durante 4 horas a cisplatino o a digoxina. Después de este tiempo, se añadió digoxina o cisplatino, en función del tratamiento inicial. Después de un tratamiento en combinación de 40 horas, la viabilidad de las células fue medida con el ensayo MTT y el parámetro de Índice de Combinación (CI) fue calculado con el software Compusyn. Ver Tabla 9 para el significado de los símbolos que representan el efecto de la combinación.

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Primer compuesto añadido		Segundo compuesto añadido		Combinación		
Conc.	% Viab. Celular	Conc.	% Viab. Celular	% Viab. Celular	CI	Efecto
1 $\mu$ M cisplatino	85,9 $\pm$ 2,3	1 nM ouabaina	79,4 $\pm$ 0,5	72,0 $\pm$ 2,9	1,0	$\pm$
		3 nM ouabaina	47,4 $\pm$ 4,0	46,1 $\pm$ 4,5	1,2	-
		10 nM ouabaina	5,9 $\pm$ 0,8	4,8 $\pm$ 0,5	0,8	++
3 $\mu$ M cisplatino	72,6 $\pm$ 2,8	1 nM ouabaina	79,4 $\pm$ 0,5	60,3 $\pm$ 0,5	1,0	$\pm$
		3 nM ouabaina	47,4 $\pm$ 4,0	42,9 $\pm$ 5,0	1,3	--
		10 nM ouabaina	5,9 $\pm$ 0,8	3,8 $\pm$ 0,4	0,7	++
10 $\mu$ M cisplatino	53,8 $\pm$ 0,2	1 nM ouabaina	79,4 $\pm$ 0,5	45,1 $\pm$ 0,2	1,0	$\pm$
		3 nM ouabaina	47,4 $\pm$ 4,0	34,0 $\pm$ 1,6	1,2	-
		10 nM ouabaina	5,9 $\pm$ 0,8	4,3 $\pm$ 0,3	0,7	++
32 $\mu$ M cisplatino	33,0 $\pm$ 2,6	1 nM ouabaina	79,4 $\pm$ 0,5	26,7 $\pm$ 0,0	0,9	$\pm$
		3 nM ouabaina	47,4 $\pm$ 4,0	22,9 $\pm$ 3,3	1,2	-
		10 nM ouabaina	5,9 $\pm$ 0,8	3,1 $\pm$ 1,0	0,6	+++
1 nM ouabaina	93,6 $\pm$ 0,9	1 $\mu$ M cisplatino	96,3 $\pm$ 2,6	80,6 $\pm$ 4,8	0,7	++
3 nM ouabaina	65,6 $\pm$ 4,5			59,6 $\pm$ 3,2	1,0	$\pm$
10 nM ouabaina	12,6 $\pm$ 4,9			8,7 $\pm$ 2,0	0,9	+
1 nM ouabaina	93,6 $\pm$ 0,9	3 $\mu$ M cisplatino	84,7 $\pm$ 3,8	74,3 $\pm$ 3,0	0,9	+
3 nM ouabaina	65,6 $\pm$ 4,5			56,0 $\pm$ 1,8	1,1	$\pm$
10 nM ouabaina	12,6 $\pm$ 4,9			13,0 $\pm$ 8,0	1,0	$\pm$
1 nM ouabaina	93,6 $\pm$ 0,9	10 $\mu$ M cisplatino	59,8 $\pm$ 2,4	53,2 $\pm$ 1,8	0,9	+
3 nM ouabaina	65,6 $\pm$ 4,5			46,4 $\pm$ 1,0	1,2	-
10 nM ouabaina	12,6 $\pm$ 4,9			17,0 $\pm$ 1,0	1,3	--
1 nM ouabaina	93,6 $\pm$ 0,9	32 $\mu$ M cisplatino	40,7 $\pm$ 2,8	38,2 $\pm$ 0,7	1,3	--
3 nM ouabaina	65,6 $\pm$ 4,5			32,0 $\pm$ 1	1,3	--
10 nM ouabaina	12,6 $\pm$ 4,9			15,4 $\pm$ 2,5	1,4	--

Tabla 12. Actividad citotóxica de ouabaína en combinación con cisplatino dependiendo del orden del tratamiento. Células cancerosas A549 fueron expuestas durante 4 horas a cisplatino o ouabaína. Después de este tiempo, se añadió ouabaína o cisplatino, en función del tratamiento inicial. Después de un tratamiento en combinación de 40 horas, la viabilidad de las células fue medida con el ensayo MTT y el parámetro de Índice de Combinación (CI) fue calculado con el software Compusyn. Ver Tabla 9 para el significado de los símbolos que representan el efecto de la combinación.

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Conc. cisplatino	Orden de tratamiento	Heterósido cardiotónico					
		Digitoxina		Digoxina		Ouabaína	
		CI (Intervalo confianza 95%)	Efecto	CI (Intervalo confianza 95%)	Efecto	CI (Intervalo confianza 95%)	Efecto
<i>Bajas</i> (1-3 $\mu$ M)	Cisplatino + Heterósidos	1,3 (1,1-1,6)	Antag.	1,0 (0,9-1,1)	Aditivo	1,0 (0,8-1,2)	Aditivo
	Heterósidos + Cisplatino	0,9 (0,7-1)	Aditivo	1,0 (0,8-1,2)	Aditivo	0,9 (0,8-1,0)	Aditivo
<i>Altas</i> (10-32 $\mu$ M)	Cisplatino + Heterósidos	0,7 (0,4-0,9)	Sinerg.	0,8 (0,8-0,9)	Sinerg.	0,9 (0,8-1,1)	Aditivo
	Heterósidos + Cisplatino	1,0 (0,8-1,1)	Aditivo	1,0 (0,8-1,2)	Aditivo	1,2 (1,1-1,4)	Antag.

Tabla 13. Media de los Índices de Combinación (CI), con un Intervalo de confianza del 95%, de las combinaciones de heterósidos cardiotónicos y cisplatino, según las concentraciones de éste último.

6.8.5. Evaluación de la actividad anticancerosa de heterósidos cardiotónicos frente a diferentes tipos de células cancerosas.

Finalmente, se decidió evaluar si la selectividad demostrada por estos tres heterósidos cardiotónicos sobre células de cáncer de pulmón también se producía en otros tipos de cáncer. Para cumplir este objetivo, diferentes líneas celulares cancerosas (MCF7, UACC-62, HT29 y HTC116) y células no malignas (MCF10 y VH10) fueron expuestas a diferentes concentraciones de los heterósidos cardiotónicos durante 48 h. La viabilidad celular fue cuantificada mediante el ensayo MTT. Los valores de IC50 obtenidos para las diferentes líneas se encuentran recogidos en la Tabla 14. Como control positivo fue utilizado el fármaco anticanceroso 5-fluorouracilo (5-FU).

Células		IC50 (media $\pm$ SEM; nM)			
		Digitoxina	Digoxina	Ouabaína	5-FU ( $\mu$ M)
No malignas	MRC-5	77,5 $\pm$ 12,4	65,1 $\pm$ 13,2	29,4 $\pm$ 4,5	>1000
	MCF10	61,3 $\pm$ 5,0	67,1 $\pm$ 22,0	41,4 $\pm$ 2,7	<0,1
	VH-10	165,4 $\pm$ 52,4	200,8 $\pm$ 62,7	60,8 $\pm$ 11,1	>1000
Cancerosas	A549	7,39 $\pm$ 0,6	8,0 $\pm$ 1,3	5,3 $\pm$ 0,4	52 $\pm$ 45
	MCF7	36,8 $\pm$ 1,6	32,9 $\pm$ 8,7	39,3 $\pm$ 1,0	0,1 $\pm$ 0
	UACC-62	143,9 $\pm$ 6,3	171,5 $\pm$ 0,6	57,4 $\pm$ 1,9	196 $\pm$ 190
	HT29	77,6 $\pm$ 4,9	> 100	74,3 $\pm$ 2,3	285 $\pm$ 62,9
	HTC116	22,8 $\pm$ 1,6	-	-	-

Tabla 14. Valores de IC50 (media  $\pm$  SEM;  $\mu$ M) de los heterósidos cardiotónicos digitoxina, digoxina y ouabaína en diferentes líneas celulares tras 48 horas de tratamiento por el ensayo MTT.

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Digoxina y digitoxina demostraron mayor actividad citotóxica sobre células cancerosas de mama MCF7 que sobre células normales de mama MCF10, pero esta selectividad fue mucho menor que la que se había observado entre células de cáncer de pulmón A549 y células normales de pulmón MRC-5. La citotoxicidad frente a ambas líneas celulares normales, MRC-5 y MCF-10, fue similar, por lo que la diferencia la marcó la actividad de estos heterósidos sobre las células cancerosas A549 y MCF7. Ambos heterósidos tuvieron unos valores de IC50 aproximadamente 4 veces mayores para células de cáncer de mama MCF7 que para las células de cáncer de pulmón A549. Por el contrario, estos heterósidos mostraron poseer menor actividad citotóxica sobre células de melanoma UACC-62 y sobre células de cáncer colorrectal HT29. Los valores de IC50 para estas células fueron superiores que los mostrados para las células normales MRC-5 y MCF7, destacando que los valores de IC50 para UACC-62 fueron similares a los obtenidos para las células normales de piel VH10. Aunque células de cáncer colorrectal HT29 mostraron ser más resistentes a digitoxina, células de cáncer colorrectal HTC116 demostraron un valor de IC50 intermedio entre los valores de IC50 de las células cancerosas MCF7 y A549.

Estas diferencias dependiendo del tipo celular también fueron observadas con ouabaína, la cual incluso no mostró la selectividad mostrada sobre células cancerosas de mama por digitoxina y digoxina. El valor de IC50 de ouabaína fue de 40-70 nM para las células cancerosas HT29, MCF7 y UACC-62, mientras que para las células normales MRC-5, MCF10 y VH10 fue de 30-60 nM. La única excepción fueron las células cancerosas de pulmón A549 que mostraron la mayor sensibilidad, con un valor de IC50 entorno a 5 nM (Tabla 14). Por tanto, ouabaína solamente mostró actividad anticancerosa selectiva sobre células cancerosas de pulmón. Los resultados obtenidos de ouabaína fueron preparados para la redacción de una publicación. Sin embargo, durante la revisión bibliográfica para la redacción del artículo se detectó un error experimental en un estudio elaborado por Hiyoshi y cols.<sup>169</sup>. En este estudio se apoyaba la entrada de ouabaína en ensayos clínicos para el tratamiento de neuroblastoma. Pero la actividad anticancerosa observada de ouabaína podría deberse a un error experimental. Por este motivo, se decidió utilizar los resultados de ouabaína comentados en los párrafos anteriores para elaborar una carta al editor titulada “*Comment on Quiescence and gamma-H2AX in neuroblastoma are regulated by Ouabain/Na,K-ATPase: ouabain and cancer*”, aceptada en la revista British Journal of Cancer, con el objetivo de aclarar el error experimental cometido por Hiyoshi y cols.<sup>169</sup>, y que es adjuntada a continuación.

Hiyoshi y cols.<sup>169</sup> observaron que ouabaína indujo quiescencia en células humanas de neuroblastoma SH-SY5Y *in vitro* y una marcada disminución del crecimiento tumoral en ratones inmunodeprimidos inoculados con esta línea celular. Las concentraciones de ouabaína requeridas para inducir quiescencias en esta línea celular humana de neuroblastoma *in vitro*

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

estuvieron entorno a 50 nM. Sin embargo, esta concentración de ouabaína también mostró inhibir la citotoxicidad de células humanas no malignas MRC-5, MCF10 y VH10, como se comentó anteriormente. Estos datos sugieren que quizás la marcada disminución del crecimiento tumoral en ratones inmunodeprimidos inoculados con las células humanas de neuroblastoma no fue debida a la actividad anticancerosa selectiva de la ouabaína. Se sabe que las células de los roedores son sobre 100 veces más resistentes que las células humanas al efecto de los heterósidos cardiotónicos<sup>145</sup>. Esta diferencia de sensibilidad entre especies sugiere que la marcada reducción del crecimiento tumoral observada en el modelo *in vivo* de Hiyoshi y cols.<sup>169</sup> pudo deberse a la capacidad de ouabaína para matar células humanas *versus* células de roedores que a su capacidad para matar células cancerosas *versus* células normales. Para comprobar esta posibilidad, células de roedor VC8B2 y VC8 fueron expuestas a ouabaína en las mismas condiciones comentadas anteriormente (48 h de exposición seguidas del ensayo MTT). Los valores de IC50 (medias  $\pm$  SEM; nM) de ouabaína para las células VC8B2 y VC8 fueron  $113700 \pm 29000$  y  $67000 \pm 2000$ , respectivamente. Teniendo en cuenta los valores de IC50 de las células humanas (Tabla 14), las células de roedor fueron aproximadamente 1000 veces más resistentes que las células humanas a la actividad citotóxica de ouabaína. Estos datos sugieren que el efecto anticanceroso inducido por ouabaína en ratones inmunodeprimidos inoculados con células humanas de neuroblastoma<sup>169</sup> es probablemente debido a las diferencias de sensibilidad entre especies y no a la inhibición selectiva del crecimiento tumoral. Por tanto, los datos obtenidos por Hiyoshi y cols.<sup>169</sup> no apoyan el uso de ouabaína en el tratamiento de pacientes con neuroblastoma.

Una vez enviada esta carta al editor para su publicación se detectó que el mismo error experimental se había producido con otros heterósidos cardiotónicos (como latanósido C y bufalin) en numerosos artículos publicados en revistas de factor de impacto alto<sup>170-174</sup>. Con el motivo de aclarar este error experimental se decidió redactar la publicación titulada “*The in vivo anti-tumor activity of cardiac glycosides in mice xenografted with human cancer cells is probably an experimental artifact*”, aceptada en la revista Oncogene, y que es adjuntada a continuación. Además de los datos de ouabaína, para esta publicación también fueron utilizados los datos de digitoxina y digoxina de la Tabla 14, junto con los datos obtenidos de la evaluación de la citotoxicidad de estos heterósidos cardiotónicos en las líneas celulares de roedor VC8B2 y VC8. Los valores de IC50 de estos heterósidos cardiotónicos también fueron aproximadamente 1000 veces más citotóxicos para las células humanas que para las células de roedor (Tabla 1 de la publicación adjuntada (Tabla 15). Estos datos sugieren que la marcada actividad anticancerosa *in vivo* de los heterósidos cardiotónicos observada en modelos de xenotrasplante en roedores puede ser un artefacto experimental causado por la capacidad de los heterósidos cardiotónicos para matar selectivamente células humanas en vez de su capacidad para matar

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

selectivamente células cancerosas. Por tanto, los resultados obtenidos de estos modelos de xenotrasplante no apoyan el uso de heterósidos cardiotónicos en el tratamiento de pacientes con estos tipos de cáncer.

Estas diferencias de citotoxicidad de los heterósidos cardiotónicos dependiendo de la línea celular podría deberse a las diferencias en la expresión de la bomba  $\text{Na}^+/\text{K}^+ \text{-ATPasa}$ <sup>150,151,175,176</sup>. A pesar de estas diferencias cabe destacar que los heterósidos cardiotónicos podrían ser útiles en el tratamiento de determinados tumores. En concreto, las concentraciones plasmáticas de digitoxina en pacientes se encuentran en el rango 19,6-32,6 nM<sup>156</sup>. Dentro de este rango de concentración, se encontraron los valores de IC50 para las células cancerosas HTC116, MCF7 y A549, incluso a concentraciones más bajas en el caso de éstas últimas, mientras que los valores de IC50 para las células normales MRC-5, MCF10 y UACC-62 estuvieron entre 3-8 veces por encima de este rango de concentración (Tabla 14).

Aunque otras células cancerosas como las HT29 no demostraron mayor sensibilidad a la citotoxicidad de los heterósidos cardiotónicos que las células normales, existen estudios en los que se ha visto que células HT29 pueden llegar a ser más sensibles cuando se ha realizado la combinación de heterósidos cardiotónicos con fármacos anticancerosos utilizados en el tratamiento del cáncer colorrectal (como 5-FU y oxaliplatino)<sup>177</sup>. De hecho, en esta tesis se comprobó como la combinación de digitoxina, digoxina u ouabaína con 5-FU podía tener un efecto sinérgico sobre células HT29 (Tabla 16). Todos estos datos sugieren el potencial real de la actividad anticancerosa de heterósidos cardiotónicos como la digitoxina.

Compuestos por separado				Combinación		
Conc.	% Viab. Celular	Conc.	% Viab. Celular	% Viab. Celular	CI	Efecto
10 $\mu\text{M}$ 5-FU	70,6 $\pm$ 2,7	32 nM digitoxina	83,5 $\pm$ 5,3	61,9 $\pm$ 2,2	0,7	++
		32 nM digoxina	92,7 $\pm$ 4,4	67,9 $\pm$ 1,0	0,8	++
		32 nM ouabaína	85,2 $\pm$ 4,9	62,5 $\pm$ 1,6	0,7	++
500 $\mu\text{M}$ 5-FU	47,2 $\pm$ 1,9	32 nM digitoxina	83,5 $\pm$ 5,3	43,1 $\pm$ 2,6	0,9	++
		32 nM digoxina	92,7 $\pm$ 4,4	47,0 $\pm$ 1,5	1,1	$\pm$
		32 nM ouabaína	85,2 $\pm$ 4,9	40,1 $\pm$ 3,9	0,7	++

Tabla 16. Actividad citotóxica de heterósidos cardiotónicos en combinación con 5-fluorouracilo (5-FU) en células de cáncer colorrectal HT29. Células cancerosas HT29 fueron expuestas durante 48 horas a 5-FU o a los heterósidos cardiotónicos, combinados o por separado. La viabilidad de las células fue medida con el ensayo MTT y el parámetro de Índice de Combinación (CI) fue calculado con el software Compusyn. Ver Tabla 9 para el significado de los símbolos que representan el efecto de la combinación.



## **6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

En conclusión, los heterósidos cardiotónicos digitoxina, digoxina y ouabaína han demostrado actividad anticancerosa selectiva sobre células de cáncer de pulmón. En el efecto citotóxico de estos heterósidos pueda estar involucrada la formación de EROs (en el caso de la ouabaína) y la inhibición de la glicólisis. También ha sido demostrado que la administración de estos heterósidos después del fármaco anticanceroso cisplatino puede inducir un ligero efecto sinérgico. Estos datos apoyan el hecho de que existan ensayos clínicos de estos heterósidos cardiotónicos para el tratamiento del cáncer de pulmón.

# Comment on 'Quiescence and $\gamma$ H2AX in neuroblastoma are regulated by Ouabain/ $\text{Na,K-ATPase}$ ': ouabain and cancer

J M Calderón-Montaña<sup>1</sup>, E Burgos-Morón<sup>1</sup> and M López-Lázaro<sup>\*,1</sup>

<sup>1</sup>Faculty of Pharmacy, Department of Pharmacology, University of Seville, Profesor García González 2, 41012 Seville, Spain

Sir,

Cardiac glycosides are promising cancer therapeutic agents (Lopez-Lazaro, 2007; Newman *et al*, 2008; Mijatovic *et al*, 2012). In a recent article published in the journal, Hiyoshi *et al* (2012) report that the cardiac glycoside ouabain induces quiescence in neuroblastoma cells *in vitro* and a marked reduction in tumour growth when human neuroblastoma cells are xenografted into immune-deficient mice. On the basis of these findings, the authors conclude that ouabain could be used in chemotherapies to suppress tumour growth and/or arrest cells to increase the therapeutic index in combination therapies (Hiyoshi *et al*, 2012).

It has been known for some time that rodent cells are over 100 times more resistant than human cells to the cytotoxic effects of ouabain and other cardiac glycosides (Gupta *et al*, 1986). This means that the anticancer effects induced by ouabain in mice harbouring human neuroblastoma cells (Hiyoshi *et al*, 2012) are probably due to interspecies differences in sensitivity and not to selective inhibition of tumour growth. In other words, the marked reduction in tumour growth observed when human neuroblastoma cells were xenografted into immune-deficient mice is probably caused by the ability of ouabain to kill human cells *vs* rodent cells rather than by its ability to kill cancer cells *vs* normal cells.

To further support this idea, three human cancer cell lines, three human non-malignant cell lines from the same origin, and two rodent cell lines have been exposed for 48 h to ouabain, and cell viability has then been estimated with the MTT assay. The  $\text{IC}_{50}$  values (means  $\pm$  s.e.m.) of three independent experiments were  $39.3 \pm 1.0 \text{ nM}$  for the human MCF7 breast cancer cell line;  $41.4 \pm 2.7 \text{ nM}$  for the human MCF10 breast non-malignant cell line;  $57.4 \pm 1.9 \text{ nM}$  for the human UACC62 melanoma cell line;  $60.8 \pm 11.1 \text{ nM}$  for the non-malignant human VH10 skin fibroblast cell line;  $5.3 \pm 0.4 \text{ nM}$  for the human A549 lung cancer cell line;  $29.4 \pm 4.5 \text{ nM}$  for the human MRC5 lung non-malignant cell line;  $67\,000 \pm 2000 \text{ nM}$  for the rodent VC8 cell line (deficient in homologous recombination repair); and  $113\,700 \pm 29\,000 \text{ nM}$  for

the rodent VC8B2 cell line (parental cell line of VC8). These results show that rodent cells are approximately 1000 times more resistant than human cells to the cytotoxic activity of ouabain and that, except for the human lung cell lines, ouabain does not inhibit the growth of the human cancer cell lines selectively. Hiyoshi *et al* (2012) reported that ouabain induced quiescence in human neuroblastoma cells at a concentration of 50 nM, and here we show that such concentration of ouabain also reduces the viability of the three human non-malignant cell lines used. The higher sensitivity of VC8 cells *vs* VC8B2 cells (Calderon-Montaña *et al*, 2012) to ouabain agree with the activation of the DNA-damage response pathway marker gamma-H2AX observed by Hiyoshi *et al* (2012) in their work.

In conclusion, the concentrations of ouabain required to induce quiescence in human neuroblastoma cells *in vitro* also reduce the viability of human non-malignant cells. In addition, the marked reduction in tumour growth observed when human neuroblastoma cells were xenografted into immune-deficient mice is probably due to the ability of ouabain to kill human cells selectively rather than by its ability to kill cancer cells selectively. These data do not support the use of ouabain in patients with neuroblastoma.

## REFERENCES

- Calderon-Montaña JM, Burgos-Moron E, Orta ML, Pastor N, Perez-Guerrero C, Austin CA, Mateos S, Lopez-Lazaro M (2012) Guanidine-reactive agent phenylglyoxal induces DNA damage and cancer cell death. *Pharmacol Rep* **64**: 1515–1525.
- Gupta RS, Chopra A, Stetsko DK (1986) Cellular basis for the species differences in sensitivity to cardiac glycosides (digitalis). *J Cell Physiol* **127**: 197–206.
- Hiyoshi H, Abdelhady S, Segerstrom L, Sveinbjornsson B, Nuriya M, Lundgren TK, Desfrere L, Miyakawa A, Yasui M, Kogner P, Johnsen JL, Andang M, Uhlen P (2012) Quiescence and gammaH2AX in

\*Correspondence: Dr M López-Lázaro, E-mail: mlopezlazaro@us.es

- neuroblastoma are regulated by ouabain/Na,K-ATPase. *Br J Cancer* **106**: 1807–1815.
- Lopez-Lazaro M (2007) Digitoxin as an anticancer agent with selectivity for cancer cells: possible mechanisms involved. *Expert Opin Ther Targets* **11**: 1043–1053.
- Mijatovic T, Dufrasne F, Kiss R (2012) Cardiotonic steroids-mediated targeting of the Na(+) /K(+) -ATPase to combat chemoresistant cancers. *Curr Med Chem* **19**: 627–646.
- Newman RA, Yang P, Pawlus AD, Block KI (2008) Cardiac glycosides as novel cancer therapeutic agents. *Mol Interv* **8**: 36–49.

Uncorrected Proof

**The *in vivo* anti-tumor activity of cardiac glycosides in mice xenografted with human cancer cells is probably an experimental artifact**

JM Calderón-Montaña, E Burgos-Morón and M López-Lázaro\*

Department of Pharmacology, Faculty of Pharmacy, University of Seville, Spain

\*Correspondence:

Dr. M. López-Lázaro

Associate Professor

Department of Pharmacology, Faculty of Pharmacy, University of Seville, Spain.

C/ Profesor Garcia Gonzalez, 41012, Sevilla, Spain.

Tel: +34 954 55 63 48. Fax: + 34 954 55 60 74.

E-mail: mlopezlazaro@us.es

In a recent paper published in *Oncogene*, Tailler *et al.* (2012) identified the cardiac glycoside ouabain as a potential antileukemic compound. They observed that ouabain was highly efficient in inhibiting the growth of human acute myeloid leukemia (AML) cells xenotransplanted in immunodeficient mice, without exerting significant toxicity on the host. The authors concluded that ouabain was a promising antileukemic agent whose activity should be evaluated in prospective clinical studies.

It has been known for some time that rodent cells are extremely more resistant than human cells to the cytotoxic effects of cardiac glycosides (both cardenolides and bufadienolides) (Gupta *et al.*, 1986). Indeed, rodent cells were found to be over 100 times more resistant than human cells to the cytotoxic activity of all tested cardiac glycosides, including ouabain (Gupta *et al.*, 1986). This means that the anticancer effects induced by cardiac glycosides in mice harboring human cancer cells are probably due to interspecies differences in sensitivity and not to selective inhibition of tumor growth. In other words, the marked reduction in tumor growth observed when human cancer cells are xenografted into immune-deficient mice is probably caused by the ability of cardiac glycosides to kill human cells *vs.* rodent cells rather than by their ability to kill cancer cells *vs.* normal cells. We detected this experimental artifact in a *PNAS* paper in which the cardiac glycoside digoxin was shown to induce a potent inhibition of tumor growth in mice xenografted with human cancer cells (Zhang *et al.*, 2008; Lopez-Lazaro, 2009). Our *Letter to the Editor* failed to reach many authors, reviewers and editors, as numerous papers containing this probable experimental artifact have been published since then (Badr *et al.*, 2011; Hiyoshi *et al.*, 2012; Tailler *et al.*, 2012; Xie *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2012; Cheng *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2013).

We propose the use of a panel of human cancer cell lines, human non-malignant cell lines and rodent cell lines to detect this experimental artifact and/or to further evaluate the cancer therapeutic potential of cardiac glycosides. Table 1 shows the cytotoxicity of the cardiac glycosides ouabain, digoxin and digitoxin against three human cancer cell lines, three human non-malignant cell lines from the same origin and two rodent cell lines. Data show that the rodent cells are approximately 1000 times more resistant than the human cells to the cytotoxic activity of these three cardiac glycosides, and that their selectivity towards the human cancer cells *vs.* the human non-malignant cells is variable and not higher than 10-fold. Tailler *et al.* (2012) observed that ouabain induced cytotoxic effects in human leukemia cells at concentrations between 100 and 1000 nM, and Table 1 shows that ouabain inhibits the growth of the three human non-malignant cell lines at concentrations between 29,4 and 60,8 nM. These data do not support the use of ouabain in patients with leukemia, and strongly suggest that the marked *in vivo* antileukemic activity observed when human leukemia cells were xenotransplanted into immunodeficient mice is an experimental artifact caused by the ability of ouabain to kill human cells selectively rather than by its ability to kill leukemia cells selectively. In contrast, we report that digitoxin inhibits the growth of the human A549 lung cancer cell line selectively and at concentrations below those commonly observed in the plasma of cardiac patients treated with this drug (20-33 nM) (Lopez-Lazaro, 2007), an observation that deserves further investigation.

## References

Badr CE, Wurdinger T, Nilsson J, Niers JM, Whalen M, Degterev A, *et al.* (2011). Lanatoside C sensitizes glioblastoma cells to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand and induces an alternative cell death pathway. *Neuro Oncol* **13**: 1213-1224.

- Calderon-Montañó JM, Burgos-Moron E, Lopez-Lazaro M (2013). Ouabain and cancer. *Br J Cancer* (In press).
- Cheng CF, Lu IH, Tseng HW, Sun CY, Lin LT, Kuo ZK, *et al.* (2013). Antitumor Effect of Periplocin in TRAIL-Resistant Human Hepatocellular Carcinoma Cells through Downregulation of IAPs. *Evid Based Complement Alternat Med* 2013:958025. doi: 10.1155/2013/958025.
- Gupta RS, Chopra A, Stetsko DK (1986). Cellular basis for the species differences in sensitivity to cardiac glycosides (digitalis). *J Cell Physiol* 127: 197-206.
- Hiyoshi H, Abdelhady S, Segerstrom L, Sveinbjornsson B, Nuriya M, Lundgren TK, *et al.* (2012). Quiescence and gammaH2AX in neuroblastoma are regulated by ouabain/Na,K-ATPase. *Br J Cancer* 106: 1807-1815.
- Lopez-Lazaro M (2007). Digitoxin as an anticancer agent with selectivity for cancer cells: possible mechanisms involved. *Expert Opin Ther Targets* 11: 1043-1053.
- Lopez-Lazaro M (2009). Digoxin, HIF-1, and cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: E26.
- Tailler M, Senovilla L, Lainey E, Thepot S, Metivier D, Sebert M, *et al.* (2012). Antineoplastic activity of ouabain and pyrithione zinc in acute myeloid leukemia. *Oncogene* 31: 3536-3546.
- Xie XB, Yin JQ, Wen LL, Gao ZH, Zou CY, Wang J, *et al.* (2012). Critical role of heat shock protein 27 in bufalin-induced apoptosis in human osteosarcomas: a proteomic-based research. *PLoS One* 7: e47375.
- Zhang DM, Liu JS, Deng LJ, Chen MF, Yiu A, Cao HH, *et al.* (2013). Arenobufagin, a natural bufadienolide from toad venom, induces apoptosis and autophagy in human hepatocellular carcinoma cells through inhibition of PI3K/Akt/mTOR pathway. *Carcinogenesis* (Epub ahead of print).
- Zhang DM, Liu JS, Tang MK, Yiu A, Cao HH, Jiang L, *et al.* (2012). Bufotalin from *Venenum Bufonis* inhibits growth of multidrug resistant HepG2 cells through G2/M cell cycle arrest and apoptosis. *Eur J Pharmacol* 692: 19-28.
- Zhang H, Qian DZ, Tan YS, Lee K, Gao P, Ren YR, *et al.* (2008). Digoxin and other cardiac glycosides inhibit HIF-1alpha synthesis and block tumor growth. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 19579-19586.

**Table 1.** Citotoxicity of ouabain, digoxin and digitoxin against human cancer cell lines, human non-malignant cell lines and rodent cell lines.

Cell line	IC <sub>50</sub> ± SEM (nM)		
	Ouabain*	Digoxin	Digitoxin
<b>UACC62</b> (human, skin, cancer)	57,4 ± 1,9	171,5 ± 0,6	143,9 ± 6,3
<b>MCF7</b> (human, breast, cancer)	39,3 ± 1,0	32,9 ± 8,7	36,8 ± 1,6
<b>A549</b> (human, lung, cancer)	5,3 ± 0,4	8,0 ± 1,3	7,39 ± 0,6
<b>VH10</b> (human, skin, non-malignant)	60,8 ± 11,1	200,8 ± 62,7	165,4 ± 52,4
<b>MCF10</b> (human, breast, non-malignant)	41,4 ± 2,7	67,1 ± 22,0	61,3 ± 5,0
<b>MRC5</b> (human, lung, non-malignant)	29,4 ± 4,5	65,1 ± 13,2	77,5 ± 12,4
<b>VC8B2</b> (rodent, lung, non-malignant)	113700 ± 29000	271700 ± 58400	118300 ± 6700
<b>VC8</b> (rodent, lung, non-malignant)	67000 ± 2000	237800 ± 62900	87800 ± 13500

All cell lines were exposed for 48 h to each cardiac glycoside, and cell viability was then estimated with the MTT assay. The IC<sub>50</sub> values (means ± SEM) of three independent experiments are shown. \*Data taken from Calderón-Montaña *et al.* (2013).



## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 6.9. LACTONAS ALFA, BETA-INSATURADAS 2-FURANONA Y 2-PIRONA.

En el apartado anterior se ha discutido la actividad anticancerosa selectiva demostrada por los heterósidos cardiotónicos. Estos heterósidos están formados por un núcleo esteroideo con un azúcar en la posición 3 y una lactona en posición 17. Esta lactona es la que permite clasificar a estos compuestos en dos clases: cardenólidos (con la lactona 2-furanona) y bufadienólidos (con la lactona 2-pirona). Estas lactonas  $\alpha,\beta$ -insaturadas no solamente se encuentran formando parte de la estructura de los heterósidos cardiotónicos, sino que se pueden encontrar en otros compuestos. Otros compuestos importantes que contienen la lactona 2-furanona en su estructura son: acetogeninas Annonaceous<sup>178</sup>, vitamina C<sup>179</sup>, 3-cloro-4-(diclorometil)-5-hidroxi-2(5H)-furanona (producto originado de la desinfección clorada del agua potable)<sup>180</sup> y 5-metilen-2-furanona (producto de descomposición de las lesiones generadas por una gran variedad de agentes inductores de daño en el ADN)<sup>181</sup>. Mientras que dentro de otros compuestos que contienen a la 2-pirona en su estructura se encuentran las cumarinas, fusapironas, bigepironas, peripironas y estilipironas<sup>182</sup>.

Al igual que los heterósidos cardiotónicos, varios de los compuestos que contienen estas lactonas poseen actividad anticancerosa<sup>178,183,184</sup>. Para evaluar si estas lactonas estaban implicadas en la actividad anticancerosa de estos compuestos y teniendo en cuenta que esta tesis tiene como objetivo la búsqueda de nuevos fármacos para el tratamiento del cáncer de pulmón, se estudió la actividad anticancerosa *in vitro* de estas lactonas en células normales de pulmón MRC-5 y células de adenocarcinoma de pulmón A549 (Figura 7 del artículo adjunto (Figura 66)). Estas lactonas demostraron tener mayor efecto citotóxico sobre células cancerosas que sobre las células normales.

La actividad anticancerosa de estas lactonas podría estar relacionada con la generación de daño en el ADN, ya que se ha descrito que ciertos heterósidos cardiotónicos, como la ouabaína<sup>143</sup>, y otros compuestos que contienen a estas lactonas son capaces de inducir lesiones en el ADN<sup>143,180,184</sup>. Para evaluar si estas lactonas eran capaces de generar daño en el ADN, se llevó a cabo el ensayo cometa, con el que se demostró que ambas lactonas indujeron daño en el ADN. Cabe destacar que la 2-pirona indujo mayores niveles de daño en el ADN que la 2-furanona (Figura 2 del artículo adjunto (Figura 67)). Para confirmar esta capacidad para inducir lesiones en el ADN, se realizó también el ensayo de inmunofluorescencia de focos de  $\gamma$ H2AX. Ambas lactonas indujeron focos de  $\gamma$ H2AX (indicador de daño en el ADN) en ambas líneas celulares (Figura 3 del artículo adjunto (Figura 68)). En esta técnica, también la 2-pirona indujo mayor número de lesiones en el ADN que la 2-furanona.

La  $\gamma$ H2AX es una histona que se encarga de señalar lesiones en el ADN que se producen por roturas de doble cadena, para reclutar los componentes de las vías de reparación

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

necesarios para restauración de dichas lesiones. De entre estas vías, la recombinación homóloga (HR) es una de las más importantes. Para comprobar si esta vía estaba implicada en la reparación del daño sobre el ADN inducido por estas lactonas, se realizó el ensayo de viabilidad celular MTT en células VC8 (células deficientes en HR por mutación en el gen BRCA2) y células VC8B2 (células VC8 complementadas con el gen BRCA2, por lo que tienen una HR funcional). Los resultados obtenidos de este ensayo (Figura 4 del artículo adjunto (Figura 69)) demuestran que ambas lactonas inducen un daño en el ADN que es reparado por HR, destacando la importancia del gen BRCA2 en la citotoxicidad de estas lactonas. Se sabe que determinados tumores poseen mutaciones en el gen BRCA2<sup>15</sup>, por lo que las células cancerosas de estos tumores podrían ser más sensibles a compuestos que llevasen en su estructura a estas lactonas, especialmente la 2-pirona que demostró una mayor implicación de la HR en la reparación de lesiones inducidas por esta lactona.

Una vez establecido que estas lactonas generaban daño en el ADN mediante la generación de roturas de doble cadena, el siguiente paso a seguir fue establecer cuál podría ser el mecanismo de acción implicado en este daño en el ADN. La capacidad de generar daño en el ADN por alguno de los compuestos que contienen a estas lactonas se ha visto asociada a su interacción con las enzimas topoisomerasas (topo)<sup>144,185,186</sup>. Esto quiere decir que estas lactonas podrían estar induciendo la formación de complejos ADN-topo, que serían los responsables de la generación de roturas de doble cadena. Para evaluar esta posibilidad, se realizó el ensayo TARDIS (Figura 5 del artículo adjunto (Figura 70)). No se observó la formación de complejos ADN-topo a las 2 h de exposición, pero sí cuando el tiempo de exposición fue más prolongado (24h). Teniendo en cuenta que estudios recientes han observado que las topoisomerasas juegan un papel importante en la fragmentación del ADN durante la apoptosis<sup>91,92</sup> y que estas lactonas solamente indujeron complejos ADN-topo cuando el tiempo de exposición fue prolongado, hizo pensar que estos complejos podrían deberse a la inducción de apoptosis por estas lactonas. Para valorar esta posibilidad, se realizó un experimento de citometría de flujo usando el ensayo de Anexina V-FITC (Figura 6 del artículo adjunto (Figura 71)). Los resultados obtenidos fueron muy distintos según la lactona a la que fueron expuestas las células. Aproximadamente el 50% de las células expuestas 24h a 2-pirona sufrieron apoptosis, por tanto, los complejos ADN-topo observados a ese mismo tiempo de exposición podrían haberse debido principalmente a la participación de las topoisomerasas en la fragmentación del ADN durante la apoptosis. Sin embargo, la exposición a 2-furanona indujo una muerte celular mayoritariamente por necrosis, lo que descartó que la apoptosis estuviese involucrada en la formación de los complejos ADN-topo demostrada por 2-furanona.

A pesar de que estas lactonas tienen capacidad de dañar el ADN y actividad anticancerosa, es necesario tener en cuenta que las concentraciones a las que mostraron dichas

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

actividades fueron del rango milimolar para poder entender la participación de estas lactonas en la actividad de los compuestos que las contienen en su estructura. Un ejemplo de la importancia de este hecho son los heterósidos cardiotónicos. En el apartado anterior se puede ver como estos compuestos tienen actividad anticancerosa a rangos de concentraciones nanomolares, por lo que se puede decir que la actividad de estos heterósidos no está mediada por sus lactonas. De todas formas, saber que estas lactonas inducen daño en el ADN y presentan actividad anticancerosa podría ayudar a predecir la actividad de compuestos que las contengan en sus estructuras y que no hayan sido estudiados todavía.

En conclusión, las lactonas  $\alpha,\beta$ -insaturadas 2-furanona y 2-pirona mostraron mayor actividad citotóxica sobre células de cáncer que sobre células normales de pulmón. Estas lactonas indujeron daño en el ADN, que podría estar mediado en parte por las enzimas ADN topoisomerasas. Este daño en el ADN puede ser reparado por la recombinación homóloga. Estos resultados pueden ayudar a entender la actividad anticancerosa y/o de dañar el ADN de aquellos compuestos que las contengan en su estructura, ayudando a la predicción de estas actividades en los compuestos que no hayan sido estudiados todavía.

Todos estos resultados se han incluido en el artículo titulado *Alpha, beta-unsaturated lactones 2-furanone and 2-pyrone induce cellular DNA damage, formation of topoisomerase I- and II-DNA complexes and cancer cell death*, el cual se encuentra en fase de revisión en la revista Toxicology Letters, y que es adjuntado a continuación.

## **6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

## Toxicology Letters

### **Alpha, beta-unsaturated lactones 2-furanone and 2-pyrone induce cellular DNA damage, formation of topoisomerase I- and II-DNA complexes and cancer cell death.**

José Manuel Calderón-Montaña<sup>†</sup>, Estefanía Burgos-Morón<sup>†</sup>, Manuel Luis Orta<sup>‡</sup>, Nuria Pastor<sup>‡</sup>,  
Caroline Austin<sup>§</sup>, Santiago Mateos<sup>‡</sup>, Miguel López-Lázaro<sup>†\*</sup>

<sup>†</sup>Department of Pharmacology, Faculty of Pharmacy, University of Seville, Seville, Spain

<sup>‡</sup>Department of Cell Biology, Faculty of Biology, University of Seville, Seville, Spain.

<sup>§</sup>Institute for Cell and Molecular Biosciences, The Medical School, University of Newcastle upon Tyne, Newcastle upon Tyne NE2 4HH, United Kingdom.

#### **Abstract**

The alpha, beta-unsaturated lactones 2-furanone and 2-pyrone are part of the chemical structure of a variety of naturally occurring compounds (e.g., cardenolides, bufadienolides, acetogenins, coumarins, and food-flavoring furanones), some of which have shown anticancer activity and/or DNA damaging effects. Here we report that 2-furanone and 2-pyrone induce cellular DNA damage (assessed by the comet assay and the gamma-H2AX focus assay) and the formation of topoisomerase I- and topoisomerase II-DNA complexes in cells (visualized and quantified in situ by the TARDIS assay). Cells mutated in BRCA2 (deficient in homologous recombination repair) were significantly hypersensitive to the cytotoxic activity of 2-pyrone, therefore suggesting that BRCA2 plays an important role in the repair of DNA damage induced by this lactone. Both lactones were cytotoxic against A549 lung cancer cells at lower concentrations than those required to kill MRC5 non-malignant lung fibroblasts. The possible involvement of 2-furanone and 2-pyrone in the anticancer and DNA-damaging activities of compounds containing these lactones is discussed.

**Keywords:**  $\gamma$ -crotonolactone,  $\alpha$ -pyrone, carcinogenesis, anticancer

\*Correspondence to:

Dr. M. López-Lázaro

Department of Pharmacology, Faculty of Pharmacy, C/ Profesor Garcia Gonzalez 2, 41012 Sevilla, Spain.

Phone: + 34 954 55 63 48

Fax: + 34 954 55 60 74

E-mail: [mlopezlazaro@us.es](mailto:mlopezlazaro@us.es)

## Introduction

The alpha, beta-unsaturated lactones 2-furanone (5H-furan-2-one) and 2-pyrone (pyran-2-one) are part of the chemical structure of a variety of naturally occurring compounds with a broad spectrum of biological activities, including antimicrobial, anticancer, cardiotonic and toxicological activities [1-4]. Cardiac glycosides are perhaps the most known compounds containing these unsaturated lactones in their structure. Cardiac glycosides consist of a steroid nucleus with a sugar moiety at position 3 and a lactone moiety at position 17 that defines the two classes of cardiac glycoside: cardenolides (with the lactone 2-furanone) and bufadienolides (with the lactone 2-pyrone). Other relevant compounds containing a 2-furanone ring in their structure are annonaceous acetogenins [5], some naturally occurring furanones (ascorbic acid, sotolone) [4, 6], the drinking-water chlorination disinfection by-product 3-chloro-4-(dichloromethyl)-5-hydroxy-2(5H)-furanone (MX) [7, 8], and 5-methylene-2-furanone (a decomposition product of a DNA lesion, 2-deoxyribonolactone, produced by a variety of DNA-damaging agents) [9]. In addition to being part of the structure of bufadienolides, the lactone 2-pyrone is contained in other naturally occurring compounds such as coumarins, fusapyrones, gibepyrone, peripyrone and styrylpyrone [1].

Several compounds containing the lactones 2-furanone and 2-pyrone have shown anticancer and/or DNA-damaging activities. For instance, accumulating evidence suggest that cardiac glycosides, which are in clinical use for the treatment of heart failure and some types of cardiac arrhythmias [10], induce selective anticancer effects [2, 3, 11, 12]. Acetogenins [5, 13], coumarins [14, 15], and the furanone ascorbic acid [16, 17] are examples of 2-furanone- or 2-pyrone-containing compounds with anticancer activity. Some compounds containing these lactones can induce DNA damage under certain circumstances, including the cardiac glycoside ouabain [18], ascorbic acid [19], and the drinking-water chlorination disinfection by-product MX [7, 8].

Evidence suggests that DNA topoisomerases (topos) might play a role in the anticancer and DNA-damaging effects of compounds containing the lactones 2-furanone and 2-pyrone (see references below). Topo I and Topo II are ubiquitous nuclear enzymes that introduce transient single- or double-strand breaks in the DNA to solve the topological problems associated with DNA replication, transcription, recombination and chromatin remodeling. Topo I and topo II are the targets of several clinically useful anticancer drugs, including etoposide and the camptothecin derivatives topotecan and irinotecan. These drugs, known as topoisomerase poisons or topoisomerase inhibitors, stabilize the normally transient topo-DNA complexes formed during the catalytic cycle of the enzyme. Then, cellular processing converts these topo-DNA complexes into permanent DNA strand breaks that trigger cell death [20-23]. The induction of topoisomerase-mediated DNA damage by these drugs may also lead to genotoxic effects; the clinical utilization of topo II poisons has indeed been associated with an increased risk of developing some types of leukemia [24]. Several studies have revealed that some cardiac glycosides [12, 25, 26] and some acetogenins [27, 28] can interact with topo I and/or topo II. In addition, 2-furanone and 2-pyrone contain an alpha, beta-unsaturated carbonyl group in their structure, and compounds having this structural feature have been found to interact with topo II via a mechanism involving protein thiolation [29].

In this article, we show that the alpha, beta-unsaturated lactones 2-furanone and 2-pyrone cause cellular DNA damage, induce the formation of topo I- and topo II-DNA complexes in cells, and inhibit the growth of cancer cell lines. The possible involvement of 2-

furanone and 2-pyrone in the DNA-damaging and anticancer activities of compounds containing these lactones is discussed.

## MATERIAL AND METHODS

### Chemicals and cell lines

2-furanone, 2-pyrone, etoposide, camptothecin, hydrogen peroxide and curcumin were purchased from Sigma. Human K562 leukemia cells were maintained as a suspension culture in RPMI 1640 medium supplemented with 10% fetal bovine serum and penicillin (50 µg/mL)/streptomycin (50 µg/mL). The human A549 lung cancer cell line, the human embryo lung fibroblastic MRC-5 cell line, the Chinese hamster ovary AA8 cell line, the homologous recombination (HR)-deficient VC8 cell line (V79 Chinese hamster lung cells mutated in BRCA2) and the VC8B2 cell line (VC8 cells complemented with human BRCA2) were maintained in DMEM supplemented with 2 mM glutamine, 50 µg/mL penicillin, 50 µg/mL streptomycin and 10% fetal bovine serum. All cell lines were cultured at 37°C in a humidified atmosphere containing 5% CO<sub>2</sub>. Cell culture reagents were obtained from Life Technologies.

### Cell proliferation assays

The XTT and MTT assays are colorimetric techniques that allow the quantitative determination of cell viability [30]. They are based on the capability of viable cells to transform the XTT salt (sodium 3'-[1-(phenylaminocarbonyl)-3,4-tetrazolium]-bis (4-methoxy-6-nitro) or the MTT salt (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) into formazan dyes. Exponentially growing cells were seeded into 96-well plates and drugs were added 24 h later. In the XTT assay, following an incubation period of 5 days, cell viability was quantified using an XTT cell proliferation kit assay (Roche, Mannheim, Germany). After drug exposure, plates were incubated for 4 h with XTT before reading them on a Bio-Rad 550 plate reader at 450 nm. In the MTT assay, following an incubation period of 2 days, medium was removed and 125 µl MTT (1 mg/ml in medium) was added to each well for 5 hours. Then, 80 µl 20% SDS in 0.02 M HCl were added, plates were incubated for 10 hours at 37 °C, and optical densities were measured at 540 nm on a multiwell plate spectrophotometer reader. In both assays, cell viability was expressed as percentage in relation to controls. All data were averaged from at least three independent experiments and were expressed as means ± standard error of the means (SEM).

### Comet assay

The single cell gel electrophoresis assay (comet assay) is a sensitive technique for the detection of DNA damage in cells and has been described in detail by Singh et al. [31]. We followed this protocol with minor modifications described previously [32]. Briefly, standard slides were immersed in 1% normal melting agarose at 55°C, left to allow the agarose to solidify and kept at 4°C until use. After cell treatments, approximately 10000 cells were mixed with 85 µl of low-melting agarose (LMA) at 37°C. This mixture was rapidly pipetted onto the slides with the first agarose layer, spread using a coverslip and kept at 4°C for 8 min to allow the LMA to solidify. The coverslips were then removed and a third layer of 100 µl LMA at 37°C was added, covered with a coverslip and allowed to solidify at 4°C for 8 min. After removing the coverslips, cells were incubated in the dark for 1 h at 4°C in a lysis solution containing 10 mM Tris-HCl, 2.5 M NaCl, 100 mM Na<sub>2</sub>-EDTA, 0.25 M NaOH, 1%



(v/v), Triton X-100 and 10% (v/v) DMSO, pH 12.0. In order to unwind the DNA, the slides were incubated for 20 min in an electrophoretic buffer containing 1 mM Na<sub>2</sub>-EDTA and 300 mM NaOH, pH 12.8. Electrophoresis was carried out at 1 V/cm for 20 min. After neutralization with 3 x 5 min washes of 0.4 M Tris-HCl pH 7.5 to remove alkali and detergent, cells were stained with the fluorochrome 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) in Vectashield (mounting medium for fluorescence H-1000, Vector Laboratories, Peterborough UK). Images of 50 randomly selected cells from each sample were analyzed using the "comet score" software. DNA damage was calculated for each comet and was expressed as % of DNA in the tail and as tail moment (defined as the product of the tail length and the fraction of total DNA in the tail).

### **Immunofluorescence $\gamma$ - H2AX focus assay**

The immunofluorescence  $\gamma$ - H2AX focus assay is a sensitive technique to evaluate DNA damage. It is based on the ability of double-strand breaks (DSBs) to trigger phosphorylation of histone H2AX on Ser-139, which leads to the formation of nuclear foci that can be visualized with anti- $\gamma$ H2AX antibodies [33, 34]. After treatments, K562 cells were pelleted at 1200 rpm for 5 min, washed two times with PBS, resuspended and incubated in cold pure methanol for 20 minutes. They were then centrifuged, resuspended in 200  $\mu$ L methanol, dropped onto coverslips and allowed to dry. AA8 cells were seeded on coverslips and allowed to attach for 24 hours. After treatments, AA8 cells were washed three times with PBS, fixed with 4% paraformaldehyde in PBS for 10 min at room temperature and washed three times with PBS. After fixation, K562 cells and AA8 cells were permeabilized with 0.5% Triton X-100 in PBS for 5 minutes and then blocked three times with 0.1% Tween 20, 1% BSA in PBS for 5 minutes each. Cells were then incubated for 1 h with a mouse anti- $\gamma$ H2AX monoclonal antibody (Upstate, 1:800 dilution). Cells were washed three times with PBS and blocked three times prior to the incubation with a secondary anti-mouse antibody linked to Alexa Fluor 488 (Invitrogen, 1:500 dilution) for 1 h. Cells were washed with PBS, blocked and washed again with PBS as indicated before. DNA was stained with DAPI and immunofluorescence was observed at 40-fold magnification with an Olympus BX 61 microscope. A total of ~200 cells/dose were scored, and cells with 10 or more foci were scored as positive. Ionizing radiation was used as a positive control for the assay; cells were exposed to 4 Gy of ionizing radiation using an X-ray irradiator (Philips MU15F) operated at 100 KV and a dose rate of 1Gy/min [35].

### **TARDIS assay**

This immunofluorescence technique employs specific antibodies to DNA topo I or topo II to detect the protein covalently bound to the DNA in individual cells. Anti-topo II polyclonal antibody  $\alpha$ CT was raised in rabbits to recombinant topo II $\alpha$  (C-terminal fragment) and detected both the  $\alpha$  and  $\beta$  isoforms of topo II. For topo I, a polyclonal human antibody (2012, Topogen) was used. Antibodies were diluted in PBS containing 0.1% Tween 20 and 1% BSA (bovine serum albumin).  $\alpha$ CT (topo II) was used at a 1:50 dilution and 2012 (topo I) at 1:1000. An anti-rabbit FITC-conjugated second antibody (1262, Sigma) was used at 1:200 dilution for topo II antibody, and a goat anti-human FITC-conjugated second antibody (F5512, Sigma) was used at 1:50 dilution for topo I [30, 36, 37]. The TARDIS assay has been described in detail previously [30, 36, 37]. Briefly, cells were seeded ( $3 \times 10^4$  cells/well) into six-well tissue culture plates. These were grown for 48 h and drugs were added to exponentially growing cells at several concentrations. Microscope slides were precoated with agarose, and drug-treated or untreated cells (control) were immediately embedded in agarose

and spread onto the slide. Slides were then placed in lysis buffer containing protease inhibitors for 30 min (after this stage slides could be stored at -20°C in PBS containing 10% glycerol), followed by 30 min in 1 M NaCl plus protease inhibitors. Slides were then washed three times in PBS (5 min/wash) and exposed to primary antisera for 1 to 2 h. Slides were washed three times in PBS containing 0.1% Tween 20 (PBST) and subsequently exposed for 1 to 2 h to a secondary antibody (anti-rabbit fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated secondary antibody, F(ab')<sub>2</sub> fragment; Sigma). Slides were washed three times in PBST followed by an overnight wash in PBS containing protease inhibitors, at 4°C. Slides were stained with Hoechst 33258 (10 µM in PBS; Sigma Chemical Co.) for 5 min and cover slips were applied and secured. Images of blue (Hoechst-stained DNA) fluorescence and green (FITC-stained covalently bound topo-DNA) immunofluorescence were then captured with an epifluorescence microscope attached to a cooled slow scan charge-coupled device camera. For each of the ~eight randomly chosen fields of view, images of blue and green fluorescence were captured to give a total of ~100 cells/dose. Images were then analyzed to quantify the levels of Hoechst (blue) fluorescence and FITC (green) immunofluorescence with Imager 2 software (Astrocam, Cambridge, UK) based on Visilog 4 (Noesis, Paris, France). All images were corrected for stray light and camera background. Additionally, images were subjected to blue and green shade correction to compensate for variation in intensity of illumination and non uniformities in light transmission [30, 36, 37].

### **Annexin V-FITC apoptosis detection assay**

Apoptosis was quantified by flow cytometric analysis (Cytomics FC 500 MPL, Beckman Coulter; CXP analysis) using Annexin V-FITC apoptosis detection kit (Cat. n°: 556547, BD Biosciences) according to the manufacturer's instructions.

### **Statistical analysis**

All data were averaged from at least three independent experiments and were expressed as means ± standard deviation of the means (SEM). For statistical analysis we used the t-test (paired, two-tailed). A P-value >0.05 is not considered statistically significant and is not represented by any symbol. A P-value <0.05 is considered to correspond with statistical significance and is indicated with an asterisk (\*), a P-value <0.01 is indicated with a double asterisk (\*\*), and a P-value <0.001 is indicated with a triple asterisk (\*\*\*)

## RESULTS AND DISCUSSION

Because the alpha, beta-unsaturated lactones 2-furanone and 2-pyrone are part of the chemical structure of a variety of naturally occurring compounds with DNA damaging and/or anticancer properties, the aim of this work was to evaluate the possible DNA-damaging and anticancer activities of these lactones in vitro. To obtain an appropriate concentration range for the DNA damage experiments, K562 leukemia cells were treated with each lactone at several concentrations for 5 days, and the percentage of cell-growth inhibition was estimated with the XTT assay; the  $IC_{50}$  values (means  $\pm$  SEM) were  $0.57 \pm 0.04$  mM for 2-furanone and  $1.26 \pm 0.36$  mM for 2-pyrone. K562 cells were then exposed to two concentrations of each lactone (0.5 and 5 mM) for 2 h and 24 h, and the possible induction of DNA damage was assessed with the comet assay. Representative photographs of cells exposed to each lactone, the quantification of DNA damage, and the percentage of cells within different ranges of DNA damage are illustrated in Figure 2. The results represented in this figure show that cells exposed for 2 h to 0.5 mM of each lactone developed significant levels of DNA damage, that both lactones induced cellular DNA damage in a dose-dependent manner, and that 2-pyrone induced higher levels of DNA damage than 2-furanone. The level of DNA damage induced by the positive control hydrogen peroxide (30  $\mu$ M, 2 h) was similar to that of 2-furanone but lower than that of 2-pyrone (Figure 2C).

The ability of 2-furanone and 2-pyrone to induce DNA damage was further assessed with another technique commonly used for DNA damage detection: the immunofluorescence  $\gamma$ -H2AX focus assay. We initially used the K562 leukemia cell line and observed in three independent experiments that cells treated with each lactone (0.5 mM, 2 h) had higher levels of fluorescence than untreated cells (Figure 3A, left panels). However, the background signal in these cancer cells was high and the number of foci (indicative of DNA damage) could not be properly quantified. We therefore used a non-malignant cell line (AA8) to corroborate the results. Three independent experiments confirmed that both lactones (0.5 mM, 2 h) increased the formation of nuclear foci in relation to control cells. Representative photographs of AA8 cells treated with each lactone and the quantification of the DNA damage are respectively shown in Figure 3A (right panels) and Figure 3B. The lactone 2-pyrone induced higher levels of DNA damage than 2-furanone, but lower than the positive control (X-rays, 4 Gy, results not shown).

Figure 3 shows that 2-furanone and 2-pyrone induce the formation of foci in the  $\gamma$ -H2AX focus assay. This assay is based on the ability of double-strand breaks to trigger phosphorylation of histone H2AX on Ser-139, which leads to the formation of nuclear foci. Since double-strand breaks can be repaired by homologous recombination (HR), we used cells with deficiencies in this DNA repair pathway to assess its possible involvement in the repair of DNA damage induced by both lactones. VC8 cells (mutated in BRCA2; deficient in HR repair) and VC8B2 cells (VC8 cells complemented with human BRCA2; functioning HR) were exposed to several concentrations of each lactone for 24 h and, after a recovery period of 48 h, cell viability was estimated with the MTT assay. Results show that cells mutated in BRCA2 are significantly hypersensitive to the cytotoxic effect of 2-pyrone (Figure 4B). Cells mutated in BRC2 were also hypersensitive to the cytotoxic activity of 2-furanone, although this effect was not statistically significant (Figure 4A). Our results indicate that BRCA2 is involved in the repair of 2-pyrone-induced DNA damage, and suggests that people carrying mutations in BRCA2 (a gene whose mutation confers increased lifetime risk of developing breast and ovarian cancer), or sporadic cancers that have acquired this mutation, might be hypersensitive to the DNA-damaging and cytotoxic effects of 2-pyrone.

As discussed in the introduction section, evidence suggested that 2-furanone and 2-pyrone could induce the formation of topoisomerase-DNA complexes. We therefore investigated the possible formation of topoisomerase I- and II-DNA complexes in cells exposed to both lactones with the TARDIS assay. Although the sensitivity of this immunofluorescence technique for detecting topo-DNA complexes is higher than that of other cell-based assays, this assay usually requires drug concentrations approximately 10-fold higher than the  $IC_{50}$  value in cell viability assays to observe a clear activity [38]. Three independent experiments revealed that K562 leukemia cells exposed for 2 h to a concentration of 5 mM of each lactone did not develop significant levels of topo I- or topo II-DNA complexes. However, there was a clear increase in the levels of both topo I- and topo II-DNA complexes when the cells were exposed for 24 h to this concentration of each lactone (Figure 5). Recent data suggest that topo I and topo II play a role in DNA fragmentation during the execution phase of apoptosis [30, 39-42]. Unlike the standard topo poisons camptothecin and etoposide, neither lactone induced significant levels of topo-DNA complexes at short exposure times (Figure 5). This made us consider the possibility that the increased levels of topo-DNA complexes observed in cells after a 24 h-exposure could be apoptotic topo-DNA complexes. Flow cytometry experiments using the Annexin V-FITC assay revealed that approximately 50% of K562 cells exposed for 24 h to 2-pyrone 5 mM were undergoing apoptosis, while only a small fraction of cells exposed to 2-furanone (24 h, 5 mM) were dying through apoptosis (Figure 6). Virtually all cells exposed to the positive control curcumin (24 h, 20  $\mu$ M), which is a potent and efficient inducer of apoptosis [43], were in apoptosis. These results suggest that DNA fragmentation during the execution phase of apoptosis is not involved in the formation of topo-DNA complexes induced by 2-furanone, but may play a role in the formation of the complexes induced by 2-pyrone. It is important to note that the induction of topo-DNA complexes in cells has been associated with both anticancer [21, 23] and carcinogenic effects [24, 44].

Several drugs containing the lactones 2-furanone and 2-pyrone in their structure, such as cardiac glycosides [2, 3, 11] and vitamin C [16], have shown selective cytotoxic activity against cancer cells. To test whether 2-furanone and 2-pyrone could induce selective cancer cell death, we evaluated the cytotoxic activity of both compounds against A549 human lung cancer cells and MRC5 human non-malignant lung fibroblasts using the MTT assay under the same experimental conditions. Our results indicate that the viability of lung cancer cells treated with specific concentrations of the lactones (e.g. 3 mM) was significantly lower than that of normal cells (Figure 7). Several compounds were screened against these two cell lines and showed no selective cytotoxicity [30, 45]. The ability of these lactones to induce DNA damage may play a role in their selective cytotoxic activity. Indeed, DNA-damaging compounds (e.g. alkylating agents, cytotoxic antibiotics and DNA topoisomerase poisons) are the most widely used anticancer drugs, and recent evidence suggests that the elevated levels of DNA damage in tumor cells and their inability to properly repair some types of DNA damage may explain why tumor cells are often more vulnerable than normal proliferating cells to these chemotherapeutic agents [46, 47].

A search of the free chemical database ChemSpider shows over 10.000 compounds containing 2-furanone or 2-pyrone in their structure. Some of them are from natural origin and have shown anticancer and/or DNA damaging activities (discussed in the introduction section). The concentration at which these compounds exert anticancer and DNA-damaging activities needs to be considered to understand the possible involvement of 2-furanone and 2-pyrone in these activities. For instance, although 2-furanone and 2-pyrone are known to play



an important role in the pharmacological activities of cardiac glycosides, these compounds induce anticancer and DNA-damaging effects at nanomolar concentrations [12]. Knowing that 2-furanone or 2-pyrone exert these effects at low milimolar concentrations, it is unlikely that the anticancer and DNA-damaging effects of cardiac glycosides are mediated by their lactone moiety. Another factor to consider is the substitution of the carbons bearing the double bond, as evidence suggests that the DNA-damaging and cytotoxic activities of compounds having alpha, beta-unsaturated carbonyl groups is higher when these carbons are unsubstituted [29]. Consideration of these factors is important to understand the possible involvement of 2-furanone and 2-pyrone in the anticancer and DNA-damaging activities of compounds having these lactones, and also to predict these activities for compounds containing these lactones that have not yet been studied.

In conclusion, this work shows for the first time that the alpha, beta-unsaturated lactones 2-furanone and 2-pyrone induce cellular DNA damage. It also shows that cells lacking BRCA2 are significantly hypersensitive to the cytotoxic activity of 2-pyrone; this suggests that homologous recombination participates in the repair of the DNA damage induced by this lactone and that cells mutated in BRCA2 may be hypersensitive to its DNA-damaging and cytotoxic effects. 2-furanone and 2-pyrone induced the formation of topoisomerase I-and topoisomerase II-DNA complexes in cells, an activity that has been associated with both anticancer and carcinogenic effects. Both lactones were cytotoxic in lung cancer cells at lower concentrations than those required to kill normal lung fibroblasts. Overall, these results may help understand the mutagenic and anticancer effects of some compounds containing 2-furanone or 2-pyrone in their structure. They may also help predict possible mutagenic and anticancer activities for compounds containing these lactones that have not yet been studied.

## Acknowledgements

This work was partially supported by a Marie Curie Individual Fellowship [MCFI-2002-01661]; Leukaemia and Lymphoma Research (formerly the Leukaemia Research Fund); the University of Seville; and Newcastle University. We would like to thank Dr. Modesto Carballo from the CITIUS Facility of the University of Seville for assistance in the flow cytometry experiments.

## REFERENCES

- [1] McGlacken, G.P. and Fairlamb, I.J. 2-Pyrone natural products and mimetics: isolation, characterisation and biological activity *Nat. Prod. Rep.* **2005**, 22, 369-85.
- [2] Prassas, I. and Diamandis, E.P. Novel therapeutic applications of cardiac glycosides *Nat. Rev. Drug Discov.* **2008**, 7, 926-35.
- [3] Newman, R.A.; Yang, P.; Pawlus, A.D.; Block, K.I. Cardiac glycosides as novel cancer therapeutic agents *Mol. Interv.* **2008**, 8, 36-49.

- [4] Colin, S.J. The naturally occurring furanones: formation and function from pheromone to food *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.* **1999**, *74*, 259-76.
- [5] Liaw, C.C.; Wu, T.Y.; Chang, F.R.; Wu, Y.C. Historic perspectives on Annonaceous acetogenins from the chemical bench to preclinical trials *Planta Med.* **2010**, *76*, 1390-404.
- [6] Podebrad, F.; Heil, M.; Reichert, S.; Mosandl, A.; Sewell, A.C.; Bohles, H. 4,5-dimethyl-3-hydroxy-2[5H]-furanone (sotolone)--the odour of maple syrup urine disease *J. Inherit. Metab Dis.* **1999**, *22*, 107-14.
- [7] Hakulinen, P.; Yamamoto, A.; Koyama, N.; Kumita, W.; Yasui, M.; Honma, M. Induction of TK mutations in human lymphoblastoid TK6 cells by the rat carcinogen 3-chloro-4-(dichloromethyl)-5-hydroxy-2(5H)-furanone (MX) *Mutat. Res.* **2011**, *725*, 43-9.
- [8] Yuan, J.; Liu, H.; Zhou, L.H.; Zou, Y.L.; Lu, W.Q. Oxidative stress and DNA damage induced by a drinking-water chlorination disinfection byproduct 3-chloro-4-(dichloromethyl)-5-hydroxy-2(5H)-furanone (MX) in mice *Mutat. Res.* **2006**, *609*, 129-36.
- [9] Roginskaya, M.; Razskazovskiy, Y.; Bernhard, W.A. 2-Deoxyribonolactone lesions in X-ray-irradiated DNA: quantitative determination by catalytic 5-methylene-2-furanone release *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* **2005**, *44*, 6210-3.
- [10] Hauptman, P.J.; Garg, R.; Kelly, R.A. Cardiac glycosides in the next millennium *Prog. Cardiovasc. Dis.* **1999**, *41*, 247-54.
- [11] Lopez-Lazaro, M. Digitoxin as an anticancer agent with selectivity for cancer cells: possible mechanisms involved *Expert. Opin. Ther. Targets.* **2007**, *11*, 1043-53.
- [12] Lopez-Lazaro, M.; Pastor, N.; Azrak, S.S.; Ayuso, M.J.; Austin, C.A.; Cortes, F. Digitoxin inhibits the growth of cancer cell lines at concentrations commonly found in cardiac patients *J Nat. Prod.* **2005**, *68*, 1642-5.
- [13] McLaughlin, J.L. Paw paw and cancer: annonaceous acetogenins from discovery to commercial products *J. Nat. Prod.* **2008**, *71*, 1311-21.
- [14] Lacy, A. and O'Kennedy, R. Studies on coumarins and coumarin-related compounds to determine their therapeutic role in the treatment of cancer *Curr. Pharm. Des.* **2004**, *10*, 3797-811.
- [15] Musa, M.A.; Cooperwood, J.S.; Khan, M.O. A review of coumarin derivatives in pharmacotherapy of breast cancer *Curr. Med. Chem.* **2008**, *15*, 2664-79.
- [16] Chen, Q.; Espey, M.G.; Krishna, M.C.; Mitchell, J.B.; Corpe, C.P.; Buettner, G.R.; Shacter, E.; Levine, M. Pharmacologic ascorbic acid concentrations selectively kill cancer cells: action as a pro-drug to deliver hydrogen peroxide to tissues *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2005**, *102*, 13604-9.

- [17] Ohno, S.; Ohno, Y.; Suzuki, N.; Soma, G.; Inoue, M. High-dose vitamin C (ascorbic acid) therapy in the treatment of patients with advanced cancer *Anticancer Res.* **2009**, *29*, 809-15.
- [18] Jornada, L.K.; Valvassori, S.S.; Arent, C.O.; Leffa, D.; Damiani, A.A.; Hainzenreder, G.; Ferreira, C.L.; Moretti, M.; Andrade, V.M.; Quevedo, J. DNA damage after intracerebroventricular injection of ouabain in rats *Neurosci. Lett.* **2010**, *471*, 6-9.
- [19] Lee, S.H.; Oe, T.; Blair, I.A. Vitamin C-induced decomposition of lipid hydroperoxides to endogenous genotoxins *Science.* **2001**, *292*, 2083-6.
- [20] Wang, J.C. Cellular roles of DNA topoisomerases: a molecular perspective *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2002**, *3*, 430-40.
- [21] Nitiss, J.L. Targeting DNA topoisomerase II in cancer chemotherapy *Nat. Rev. Cancer.* **2009**, *9*, 338-50.
- [22] Nitiss, J.L. DNA topoisomerase II and its growing repertoire of biological functions *Nat. Rev. Cancer.* **2009**, *9*, 327-37.
- [23] Pommier, Y. Topoisomerase I inhibitors: camptothecins and beyond *Nat. Rev. Cancer.* **2006**, *6*, 789-802.
- [24] Mistry, A.R.; Felix, C.A.; Whitmarsh, R.J.; Mason, A.; Reiter, A.; Cassinat, B.; Parry, A.; Walz, C.; Wiemels, J.L.; Segal, M.R.; Ades, L.; Blair, I.A.; Osheroff, N.; Peniket, A.J.; Lafage-Pochitaloff, M.; Cross, N.C.; Chomienne, C.; Solomon, E.; Fenaux, P.; Grimwade, D. DNA topoisomerase II in therapy-related acute promyelocytic leukemia *N. Engl. J Med.* **2005**, *352*, 1529-38.
- [25] Bielawski, K.; Winnicka, K.; Bielawska, A. Inhibition of DNA topoisomerases I and II, and growth inhibition of breast cancer MCF-7 cells by ouabain, digoxin and proscillaridin A *Biol. Pharm. Bull.* **2006**, *29*, 1493-7.
- [26] Lopez-Lazaro, M.; Pastor, N.; Azrak, S.S.; Ayuso, M.J.; Cortes, F.; Austin, C.A. Digitoxin, at concentrations commonly found in the plasma of cardiac patients, antagonizes etoposide and idarubicin activity in K562 leukemia cells *Leuk. Res.* **2006**, *30*, 895-8.
- [27] Lopez-Lazaro, M.; Martin-Cordero, C.; Bermejo, A.; Cortes, D.; Ayuso, M.J. Cytotoxic compounds from Annonaceus species as DNA topoisomerase I poisons *Anticancer Res.* **2001**, *21*, 3493-7.
- [28] Takahashi, S.; Yonezawa, Y.; Kubota, A.; Ogawa, N.; Maeda, K.; Koshino, H.; Nakata, T.; Yoshida, H.; Mizushima, Y. Pyranicin, a non-classical annonaceous acetogenin, is a potent inhibitor of DNA polymerase, topoisomerase and human cancer cell growth *Int. J. Oncol.* **2008**, *32*, 451-8.
- [29] Wang, H.; Mao, Y.; Chen, A.Y.; Zhou, N.; LaVoie, E.J.; Liu, L.F. Stimulation of topoisomerase II-mediated DNA damage via a mechanism involving protein thiolation *Biochemistry.* **2001**, *40*, 3316-23.



- [30] Lopez-Lazaro, M.; Calderon-Montano, J.M.; Burgos-Moron, E.; Austin, C.A. Green tea constituents (-)-epigallocatechin-3-gallate (EGCG) and gallic acid induce topoisomerase I- and topoisomerase II-DNA complexes in cells mediated by pyrogallol-induced hydrogen peroxide *Mutagenesis*. **2011**, *26*, 489-98.
- [31] Singh, N.P.; McCoy, M.T.; Tice, R.R.; Schneider, E.L. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells *Experimental Cell Research* **1988**, *175*, 184-91.
- [32] Pastor, N.; Lopez-Lazaro, M.; Tella, J.L.; Baos, R.; Hiraldo, F.; Cortes, F. Assessment of genotoxic damage by the comet assay in white storks (*Ciconia ciconia*) after the Donana Ecological Disaster *Mutagenesis*. **2001**, *16*, 219-23.
- [33] Watters, G.P.; Smart, D.J.; Harvey, J.S.; Austin, C.A. H2AX phosphorylation as a genotoxicity endpoint *Mutat. Res.* **2009**, *679*, 50-8.
- [34] Lobrich, M.; Shibata, A.; Beucher, A.; Fisher, A.; Ensminger, M.; Goodarzi, A.A.; Barton, O.; Jeggo, P.A. gammaH2AX foci analysis for monitoring DNA double-strand break repair: strengths, limitations and optimization *Cell Cycle*. **2010**, *9*, 662-9.
- [35] Pastor, N.; Pinero, J.; Ortiz, T.; Mateos, J.C.; De Miguel, M.; Cortes, F. Topoisomerase activities and levels in irradiated Chinese hamster AA8 cells and in its radiosensitive mutant EM9 *Int. J. Radiat. Biol.* **1999**, *75*, 1035-42.
- [36] Cowell, I.G.; Tilby, M.J.; Austin, C.A. An overview of the visualisation and quantitation of low and high MW DNA adducts using the trapped in agarose DNA immunostaining (TARDIS) assay *Mutagenesis*. **2011**, *26*, 253-60.
- [37] Willmore, E.; Frank, A.J.; Padget, K.; Tilby, M.J.; Austin, C.A. Etoposide targets topoisomerase IIalpha and IIbeta in leukemic cells: isoform-specific cleavable complexes visualized and quantified in situ by a novel immunofluorescence technique *Mol. Pharmacol.* **1998**, *54*, 78-85.
- [38] Lopez-Lazaro, M.; Willmore, E.; Jobson, A.; Gilroy, K.L.; Curtis, H.; Padget, K.; Austin, C.A. Curcumin induces high levels of topoisomerase I- and II-DNA complexes in K562 leukemia cells *J Nat. Prod.* **2007**, *70*, 1884-8.
- [39] Sordet, O.; Khan, Q.A.; Kohn, K.W.; Pommier, Y. Apoptosis induced by topoisomerase inhibitors *Curr. Med. Chem. Anticancer Agents*. **2003**, *3*, 271-90.
- [40] Sordet, O.; Khan, Q.A.; Pommier, Y. Apoptotic topoisomerase I-DNA complexes induced by oxygen radicals and mitochondrial dysfunction *Cell Cycle*. **2004**, *3*, 1095-7.
- [41] Sordet, O.; Goldman, A.; Pommier, Y. Topoisomerase II and tubulin inhibitors both induce the formation of apoptotic topoisomerase I cleavage complexes *Mol. Cancer Ther.* **2006**, *5*, 3139-44.

- [42] Lopez-Lazaro, M.; Willmore, E.; Elliott, S.L.; Austin, C.A. Selenite induces topoisomerase I and II-DNA complexes in K562 leukemia cells *Int. J. Cancer*. **2008**, *123*, 2217-21.
- [43] Lopez-Lazaro, M. Anticancer and carcinogenic properties of curcumin: considerations for its clinical development as a cancer chemopreventive and chemotherapeutic agent *Mol. Nutr. Food Res*. **2008**, *52 Suppl 1*:S103-27., S103-S127.
- [44] Strick, R.; Strissel, P.L.; Borgers, S.; Smith, S.L.; Rowley, J.D. Dietary bioflavonoids induce cleavage in the MLL gene and may contribute to infant leukemia *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2000**, *97*, 4790-5.
- [45] Vega-Perez, J.M.; Palo-Nieto, C.; Periñan, I.; Vega-Holm, M.; Calderon-Montano, J.M.; Lopez-Lazaro, M.; Iglesias-Guerra, F. Stereoselective Dihydroxylation Reaction of Alkenyl  $\beta$ -D-Hexopyranosides: A Methodology for the Synthesis of Glycosylglycerol Derivatives and 1-O-Acyl-3-O- $\beta$ -D-glycosyl-*sn*-glycerol Analogues *Eur. J. Org. Chem.* **2012**, *6*, 1237-52.
- [46] Luo, J.; Solimini, N.L.; Elledge, S.J. Principles of cancer therapy: oncogene and non-oncogene addiction *Cell*. **2009**, *136*, 823-37.
- [47] Helleday, T.; Petermann, E.; Lundin, C.; Hodgson, B.; Sharma, R.A. DNA repair pathways as targets for cancer therapy *Nat. Rev. Cancer*. **2008**, *8*, 193-204.

## Figure captions

**Figure 1.** Chemical structures of the lactones 2-furanone and 2-pyrone.

**Figure 2.** Assessment of 2-furanone (2F)- and 2-pyrone (2P)-induced DNA damage in K562 cells by the comet assay. A) Representative photographs of untreated cells, of cells treated with the positive control hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ), and of cells exposed for different times to several concentrations of 2F and 2P. B) Quantification of DNA damage expressed as % of DNA damage in tail and as tail moment (tail length x percentage of DNA in the tail). C) Distribution of cells in the different intervals of values of tail moments (data are averaged from three independent experiments).

**Figure 3.** Assessment of 2-furanone (2F)- and 2-pyrone (2P)-induced DNA damage in K562 cells and AA8 cells by the immunofluorescence  $\gamma$ -H2AX focus assay. A) Representative photographs of control cells and cells exposed to 2F and 2P (2 h, 0.5 mM). B) Quantification of nuclear foci in non-malignant AA8 cells exposed to 2F and 2P (2 h, 0.5 mM).

**Figure 4.** Role of homologous recombination (HR) in the repair of DNA damage induced by the lactones 2-furanone (2F)- and 2-pyrone (2P). VC8 cells (mutated in BRCA2; deficient in HR repair) and VC8-B2 cells (VC8 cells complemented with human BRCA2; HR proficient) were exposed to several concentrations of each lactone for 24 h and, after a recovery period of 48 h, cell viability was estimated with the MTT assay.

**Figure 5.** 2-furanone (2F)- and 2-pyrone (2P) induce topo I- and topo II-DNA complexes in K562 leukemia cells (TARDIS assay). In A) and C), representative immunofluorescence images are shown; FITC fluorescence represents covalently bound topo-DNA. In B) and D), integrated fluorescence values (arbitrary units), indicating levels of topo I-DNA complexes (B) and topo II-DNA complexes (D), have been quantified and shown in individual cells. Camptothecin (cpt) and etoposide (etop) were used as positive controls.

**Figure 6.** Assessment of 2-furanone (2F)- and 2-pyrone (2P)-induced apoptosis by the annexin V-FITC apoptosis detection assay. Curcumin was used as positive control.

**Figure 7.** A549 human lung cancer cells are more sensitive than MRC5 human non-malignant lung fibroblasts to the cytotoxic activity of 2-furanone (2F)- and 2-pyrone (2P). A) Representative photographs of A549 and MRC5 cells cultured in 96-well plates in the absence (control) or presence of 2F and 2P (3 mM, 48 h exposure). In B) and C) A549 and MRC5 cells were exposed to several concentrations of 2F and 2P for 48h and cell viability was assessed with the MTT assay.

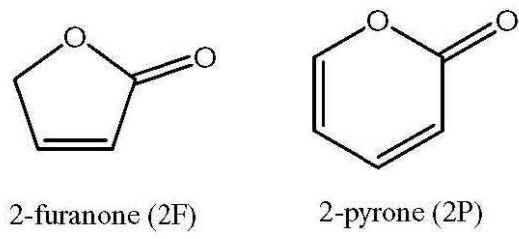


Figure 1

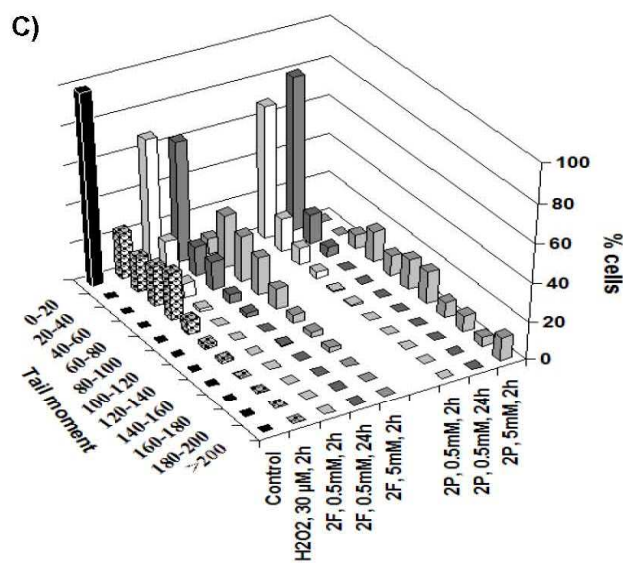
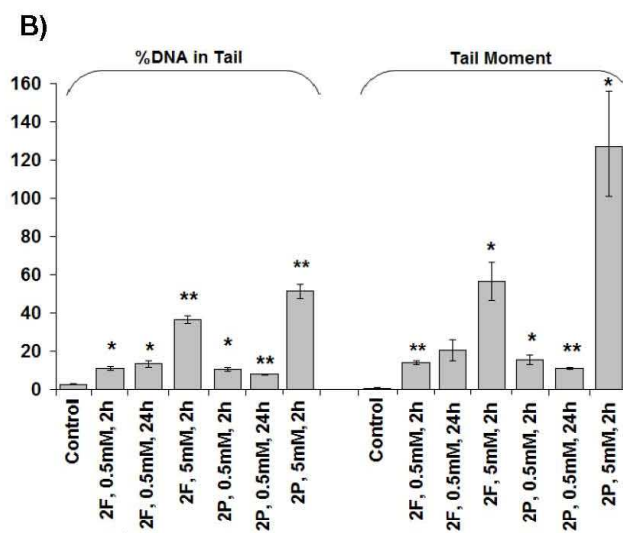
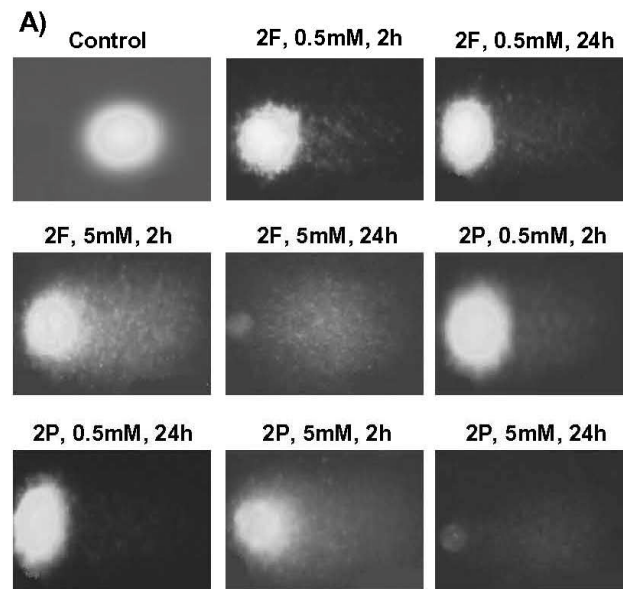


Figure 2



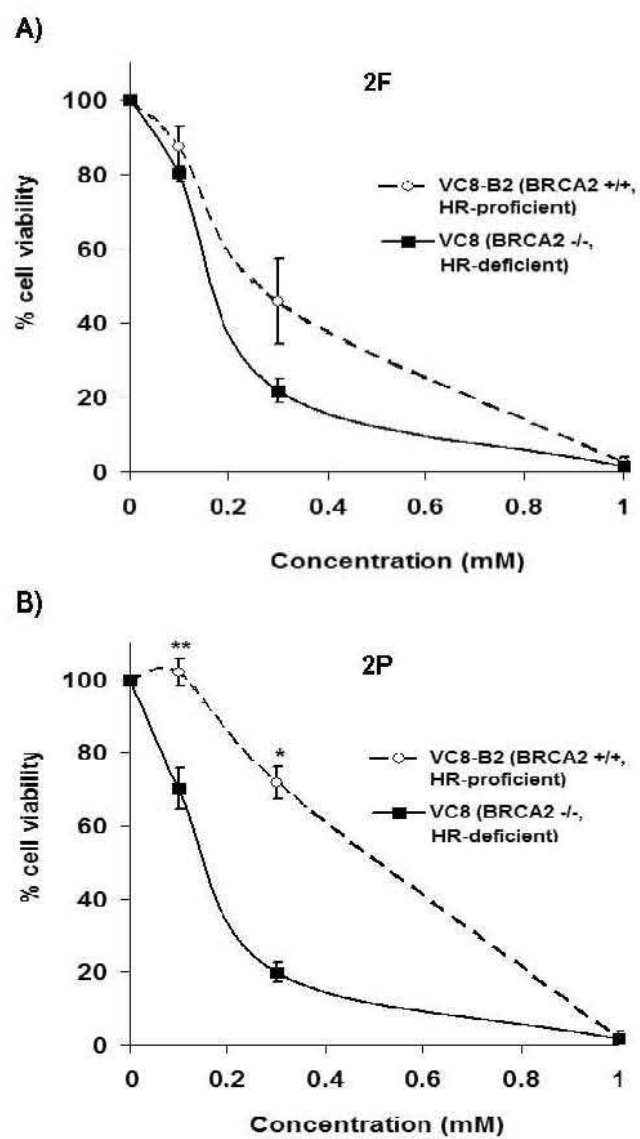


Figure 4



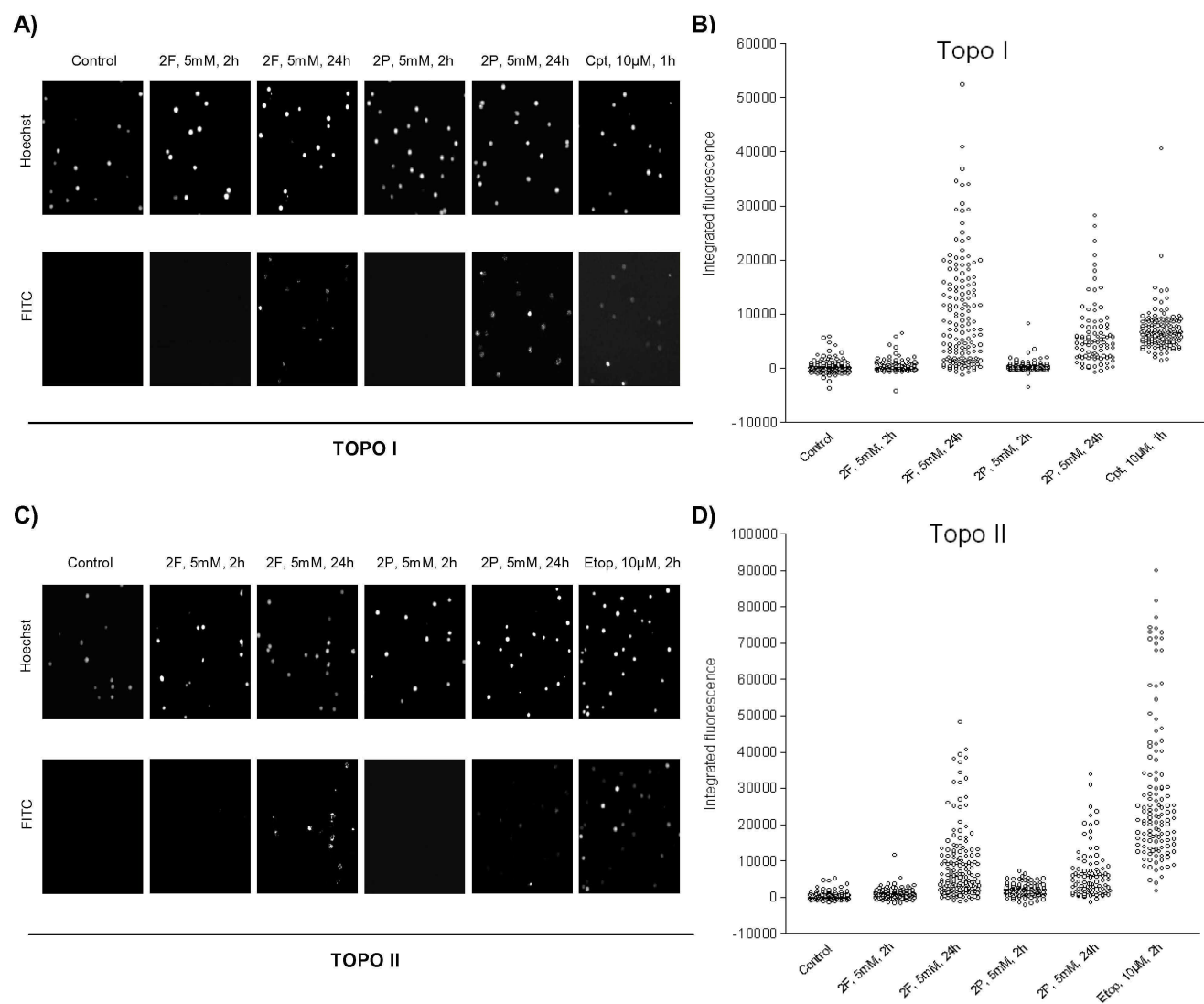


Figure 5

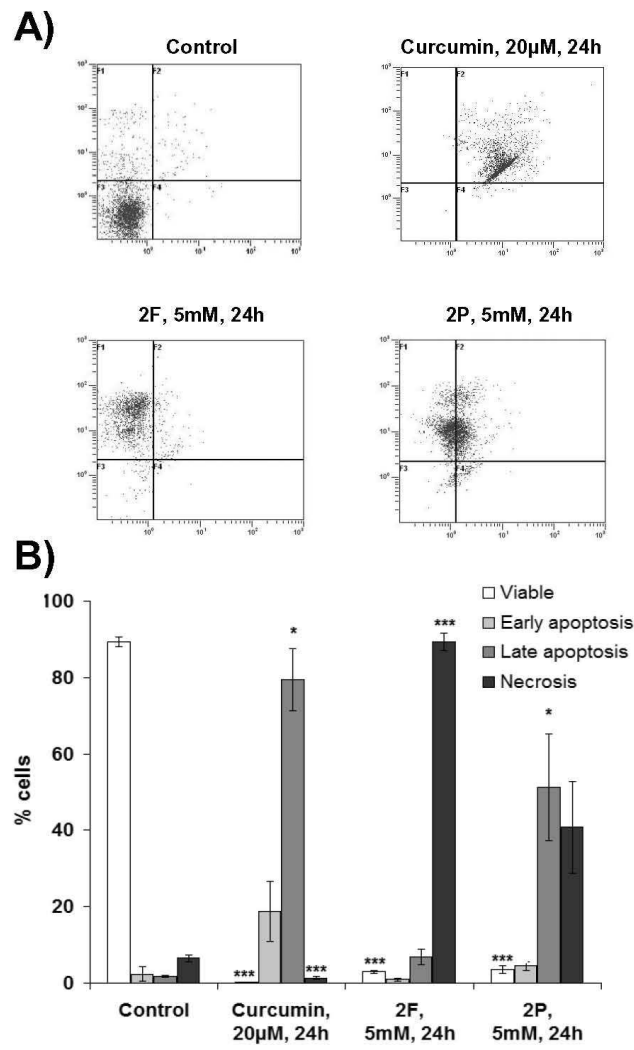


Figure 6

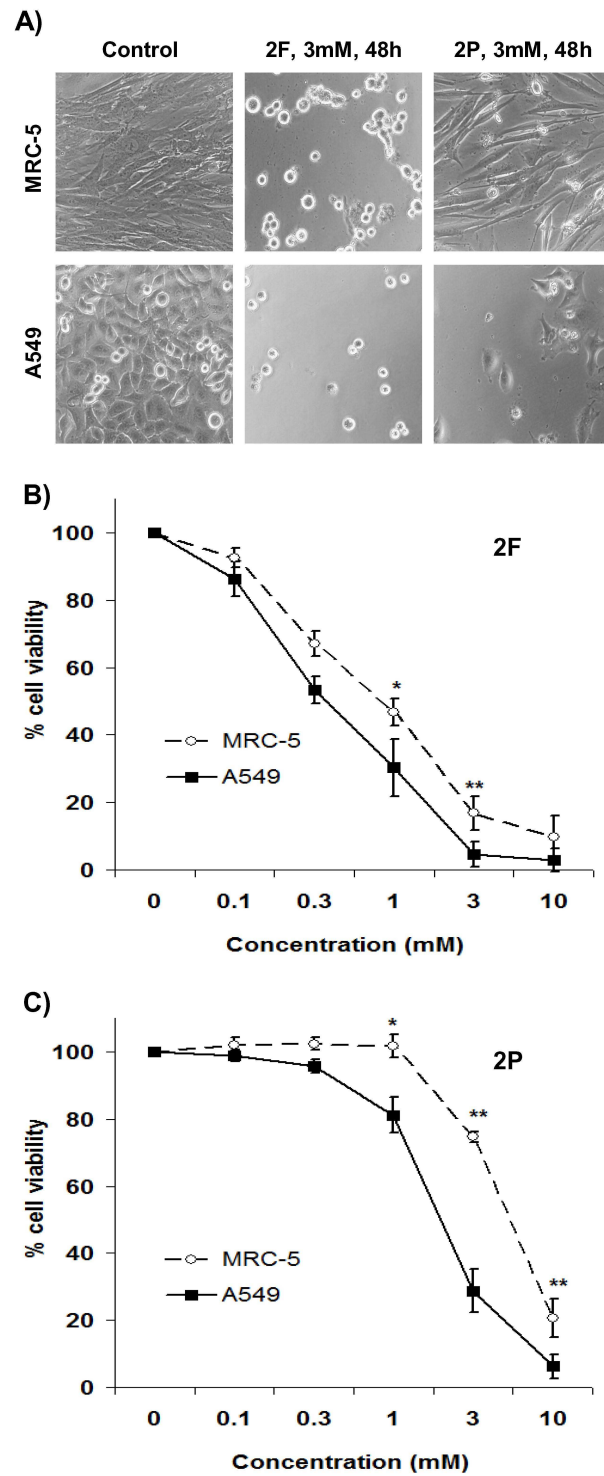


Figure 7

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 6.10. INHIBIDORES DE GLICÓLISIS 2-DEOXIGLUCOSA, DICLOROACETATO Y BROMOPIRUVATO.

La inhibición de la glicólisis se encuentra entre las estrategias seguidas durante esta tesis para la búsqueda de nuevos fármacos anticancerosos más selectivos. Se ha demostrado que las células cancerosas dependen en mayor medida de la glicólisis que las células normales para poder cubrir sus necesidades energéticas y metabólicas<sup>40,187</sup>. Se piensa que la inhibición de la glicólisis provocaría una desestabilización metabólica en las células cancerosas que induciría su muerte celular, mientras que las células normales no se verían afectadas<sup>25,76</sup>. Entre los primeros inhibidores de glicólisis estudiados se encuentran la 2-deoxiglucosa (2DG), el dicloroacetato (DCA) y el bromopiruvato (BrP) (Figura 72)<sup>188</sup>. La 2DG es un análogo de la glucosa que actúa inhibiendo de forma no competitiva a la hexoquinasa y de forma competitiva a la fosfoglucosa isomerasa, las dos primeras enzimas de la ruta glicolítica, por lo que inhibe la glicólisis. Esto hace que las células dependan de la fosforilación oxidativa para poder producir energía en forma de ATP. El BrP también actúa inhibiendo a la hexoquinasa, por lo que también inhibe a la glicólisis desde el inicio de la ruta. A diferencia de estos dos inhibidores, el DCA actúa en un punto más avanzado de la glicólisis. DCA actúa inhibiendo a la piruvato dehidrogenasa quinasa (PDK). PDK es un regulador negativo de la piruvato dehidrogenasa (PDH) (enzima que cataliza el paso de piruvato a acetil-CoA necesario para su entrada en el ciclo de ácidos tricarboxílicos), por lo que el piruvato es desviado hacia la producción de lactato, resultando en la desviación del metabolismo desde la fosforilación oxidativa hacia la glicólisis. La inhibición de PDK por DCA induce la activación de PDH, incrementando el metabolismo del piruvato hacia acetil-CoA, desviando el metabolismo hacia la fosforilación oxidativa y, por tanto, disminuyendo la glicólisis.

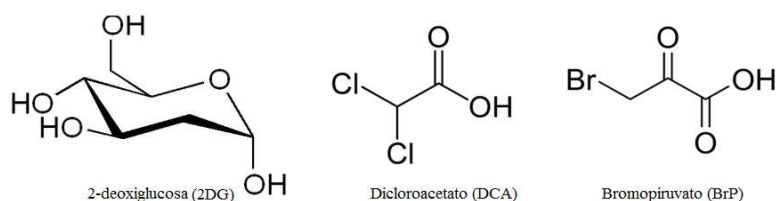


Figura 72. Estructura química de los inhibidores de la glicólisis 2-deoxiglucosa, dicloroacetato y bromopiruvato.

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 6.10.1. Evaluación de la actividad anticancerosa de 2-deoxiglucosa, dicloroacetato y bromopiruvato.

Los tres inhibidores han demostrado tener actividad citotóxica frente a una gran variedad de células cancerosas tanto *in vitro* como *in vivo*<sup>44,189-195</sup>, lo que ha hecho que DCA y 2DG hayan entrado en distintos estudios clínicos (para mayor información: [www.clinicaltrials.gov](http://www.clinicaltrials.gov)). Sin embargo, no está clara la actividad selectiva de estos compuestos frente a células cancerosas. Washington y cols.<sup>195</sup> estudiaron la influencia de DCA sobre la viabilidad celular de varias líneas celulares normales y cancerosas, observando que algunas de las líneas celulares normales se vieron afectadas del mismo modo que las células cancerosas. Por otra parte, Madhok y cols.<sup>45</sup> observaron que a concentraciones bajas, DCA mostró mayor actividad citotóxica sobre células cancerosas que sobre células normales. Con el objetivo de aclarar estas diferencias de selectividad y teniendo en cuenta que el objetivo principal de esta tesis es la búsqueda de nuevos fármacos contra el cáncer de pulmón, se evaluó la actividad anticancerosa de estos tres inhibidores de la glicólisis mediante el ensayo de viabilidad celular MTT en células de pulmón. Para ello, células normales MRC-5 y células cancerosas A549 de pulmón fueron expuestas a estos tres inhibidores durante 48 h. La Figura 73 muestra los resultados obtenidos con estos inhibidores. Ninguno de los tres inhibidores mostró mayor citotoxicidad sobre células cancerosas, siendo incluso ligeramente más citotóxico frente a células normales en el caso de la 2DG.

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

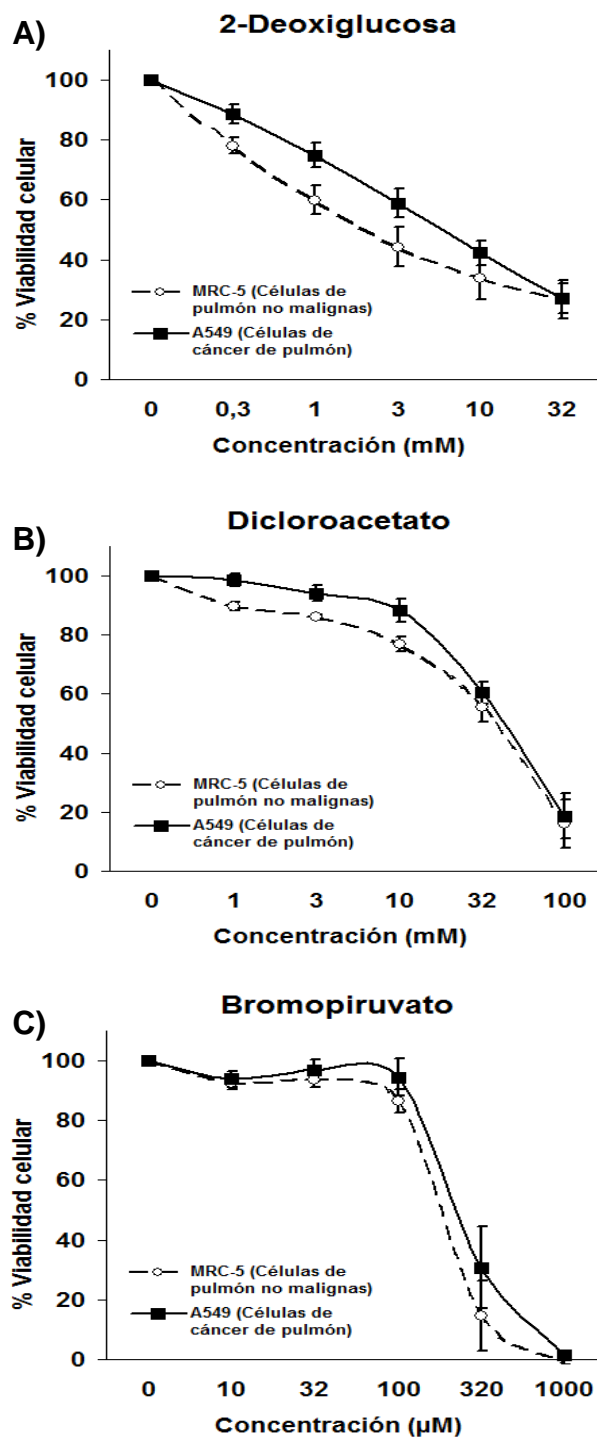


Figura 73. Evaluación de la citotoxicidad de inhibidores de glicólisis en células de pulmón. Células cancerosas A549 y células normales MRC-5 fueron expuestas a 2DG (A), DCA (B) y BrP (C) durante 48 h (MTT).

Estos resultados no apoyan la idea de que los inhibidores de la glicólisis presentan selectividad sobre células cancerosas. Para profundizar con esta idea, se decidió probar la

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

citotoxicidad de estos compuestos sobre otras líneas celulares: células de melanoma UACC-62 frente a sus correspondientes células normales VH10 (Figura 74 y Tabla 17). En estas dos líneas, BrP volvió a mostrar igual citotoxicidad para ambas líneas celulares. Sin embargo, tanto 2DG como DCA mostraron una elevada actividad anticancerosa selectiva frente a células de melanoma.

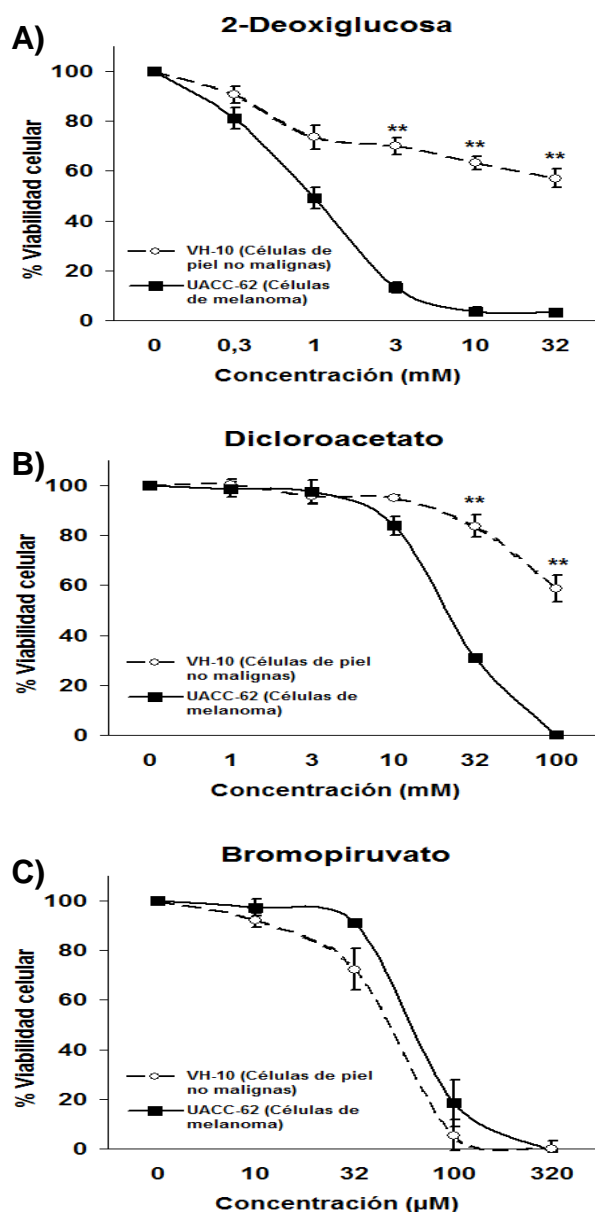


Figura 74. Evaluación de la citotoxicidad de inhibidores de glicólisis en células de piel. Células cancerosas UACC-62 y células normales VH10 fueron expuestas a 2DG (A), DCA (B) y BrP (C) durante 48 h (MTT).

La falta de selectividad mostrada por BrP podría deberse a que este compuesto también es capaz de inhibir a la succinato dehidrogenasa, enzima del ciclo de los ácidos tricarboxílicos<sup>196</sup>.



## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Por tanto, BrP estaría actuando impidiendo la síntesis de ATP tanto a nivel de la glicólisis como a nivel de la fosforilación oxidativa, lo que explicaría que este compuesto haya resultado tan citotóxico en las cuatro líneas celulares aquí ensayadas.

Compuesto	IC50 (media $\pm$ SEM; mM)			
	MRC-5	A549	VH10	UACC-62
2DG	2,63 $\pm$ 1,24	6,97 $\pm$ 2,63	>32	0,97 $\pm$ 0,13
DCA	40,67 $\pm$ 7,55	46,07 $\pm$ 7,15	>100	20,82 $\pm$ 0,93
BrP	0,21 $\pm$ 0,04	0,27 $\pm$ 0,06	0,05 $\pm$ 0,00	0,06 $\pm$ 0,00

Tabla 17. Valores de IC50 (media  $\pm$  SEM; mM) de las diferentes líneas celulares tras 48 h de exposición a los distintos inhibidores de glicólisis.

La diferencia de selectividad de 2DG y DCA dependiendo del tipo de línea celular podría deberse a la capacidad de cada línea para resistir el cambio metabólico inducido por estos compuestos, así como a la dependencia de la glicólisis de cada línea celular. Para comprobar esto último, se midieron las concentraciones de lactato (producto final de la glicólisis) y de glucosa (producto inicial de la glicólisis) en las cuatro líneas celulares. Los resultados obtenidos están recogidos en la Figura 75, en la que se puede observar como UACC-62 fue la línea celular que produjo mayores niveles de lactato y consumió mayores niveles de glucosa, por tanto, fue la línea con mayor actividad glicolítica. Esta mayor actividad glicolítica podría explicar el por qué las células UACC-62 fueron también las células con mayor sensibilidad a los inhibidores de la glicólisis, presentando los menores valores de IC50 para ambos compuestos (Tabla 17).

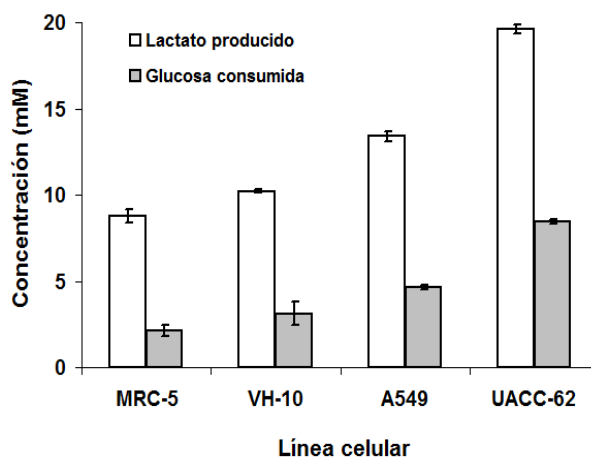


Figura 75. Concentraciones (mM) de lactato producido y de glucosa consumida por las diferentes líneas celulares. Esta figura recoge las concentraciones de lactato producido y glucosa consumida durante 8 horas por las cuatro líneas celulares.

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 6.10.2. Evaluación de la combinación de inhibidores de la glicólisis y agentes prooxidantes.

Los resultados obtenidos en el apartado anterior sugieren que la inhibición de la glicólisis por si sola no es suficiente para causar una muerte selectiva de células cancerosas, salvo en aquellos cánceres más sensibles al cambio metabólico inducido por la inhibición de la glicólisis. Sin embargo, estos inhibidores podrían ser útiles en combinación con otros compuestos. Se sabe que uno de los papeles de la glicólisis es ayudar a mantener el nivel de las EROs. Las células cancerosas tienen elevados niveles basales de EROs por lo que dependen de la glicólisis, entre otros mecanismos, para poder mantenerlos dentro del umbral no tóxico. La inhibición de la glicólisis podría hacer a las células cancerosas más susceptibles al estrés oxidativo, por lo que la combinación de inhibidores de glicólisis con agentes prooxidantes podría presentar un efecto sinérgico<sup>25</sup>. Por tanto, aunque los inhibidores de glicólisis evaluados aquí no han mostrado una actividad anticancerosa selectiva frente a células de cáncer de pulmón, podrían contribuir a aumentar la selectividad de agentes prooxidantes, como el pirogalol. Para comprobar esta posibilidad, fibroblastos normales de pulmón MRC-5 y células de adenocarcinoma de pulmón A549 fueron expuestas a los inhibidores de glicólisis (DCA y 2DG) durante 4 horas, tras las cuales fue adicionado el agente prooxidante pirogalol (PG). Tras 4 horas de tratamiento en combinación, se retiró el tratamiento y las células fueron incubadas durante 40 horas más. Finalmente, la viabilidad celular fue medida mediante el ensayo MTT. Los resultados están recogidos en la Figura 76. Tanto DCA como 2DG aumentaron, a concentraciones ligeramente citotóxicas, el efecto anticanceroso selectivo de PG.

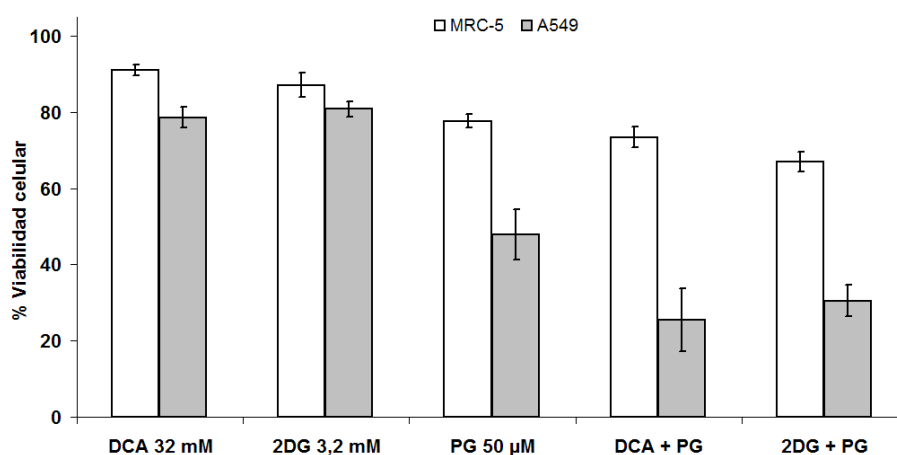


Figura 76. Actividad citotóxica de los inhibidores glicólisis DCA y 2DG en combinación con el agente prooxidante PG. Las células cancerosas A549 y las células normales MRC-5 fueron expuestas 4 h a los inhibidores de glicólisis. Tras ese tiempo, PG fue adicionado a las células. Finalmente, tras 4 horas de tratamiento combinado, éste fue retirado y las células fueron incubadas 40 h libres de compuestos (ensayo MTT).

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En conclusión, aunque la glicólisis es una posible nueva diana terapéutica, los inhibidores de glicólisis más conocidos actualmente (bromopiruvato, 2-deoxiglucosa y dicloroacetato) no poseen la misma actividad anticancerosa selectiva frente a todos los tipos de células cancerosas, tanto en las utilizadas durante esta tesis, como en otros estudios<sup>45,195</sup>. Por tanto, la utilidad de estos inhibidores se limita a tipos específicos de cáncer. Sin embargo, la combinación de estos inhibidores con agentes prooxidantes podría potenciar el efecto anticanceroso selectivo de estos últimos.

### 6.11. ANTAGONISTAS DEL RECEPTOR NEUROKININA-1 (NK-1).

En la búsqueda de nuevos fármacos anticancerosos más selectivos, la comprensión de la biología y el microambiente de los tumores es una herramienta básica para la identificación de nuevas dianas terapéuticas. Fruto de esta investigación ha sido el descubrimiento del papel que juegan determinados péptidos, como la sustancia P, en el cáncer<sup>197,198</sup>.

La sustancia P (SP) es un undecapéptido de origen natural que pertenece a la familia de las taquicininas<sup>197</sup>. La acción biológica de esta familia de taquicininas está mediada por los receptores de neurokinina (NK) que están asociados a proteína G. Existen tres tipos de receptores: NK-1, NK-2 y NK-3; teniendo la SP mayor afinidad por el receptor NK-1. El receptor NK-1 se encuentra distribuido en el sistema nervioso central, el sistema nervioso periférico y el sistema circulatorio de los mamíferos. La activación de este receptor por la SP está involucrada en la regulación de diversos procesos biológicos (como el dolor y la inflamación), participando en la regulación de condiciones inflamatorias (como migraña, asma, etc.), del reflejo nauseoso y de determinados desórdenes del sistema nervioso central (como la ansiedad y la depresión). Como consecuencia, la industria farmacéutica ha empezado a desarrollar antagonistas de receptores NK-1 para el tratamiento de los desórdenes fisiológicos en los que están involucrados. El primer antagonista de los receptores NK-1 comercializado fue el Aprepitant cuyo uso está indicado para el tratamiento de los vómitos y náuseas provocados por la quimioterapia<sup>199</sup>.

Recientemente se ha descubierto que los receptores NK-1 juegan un papel importante en el desarrollo y mantenimiento de un microambiente favorable para los tumores<sup>197,198</sup>. La activación de estos receptores ha sido asociada con procesos de mitogénesis, angiogénesis, migración celular y metástasis. De hecho, datos recientes indican que los receptores NK-1 están sobreexpresados en una gran variedad de tipos de cáncer, incluyendo cáncer de mama, de pulmón, de ovario, de próstata, leucemias, entre otros<sup>197,198,200,201</sup>. Incluso se ha llegado a establecer una posible correlación entre la expresión de estos receptores y el grado de

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

malignidad de las células tumorales. Todos estos datos sugieren que los receptores NK-1 podrían ser una nueva diana terapéutica en el tratamiento del cáncer.

Con este objetivo, el grupo de investigación de la Dra. Inmaculada Fernández Fernández del departamento de Química Orgánica y Farmacéutica de la Universidad de Sevilla junto con el grupo de investigación del Dr. Nouredine Khiar del Centro Superior de Investigaciones Científicas de Sevilla han elaborado una librería de antagonistas del receptor NK-1 a partir de modificaciones del que se piensa es el farmacóforo de este tipo de receptor, el 2-amino-4H-pirano (Figura 77). Durante esta tesis se ha realizado un cribado o *screening* de la posible actividad anticancerosa selectiva de 26 nuevos antagonistas del receptor NK-1. La síntesis de estos compuestos se encuentra en proceso de ser patentado. Por este motivo, el nombre químico de los compuestos no es recogido en este texto, sino que a cada compuesto se le otorga un nombre en clave. Como control fue utilizado el primer antagonista no peptídico del receptor NK-1, el compuesto CP-96345.

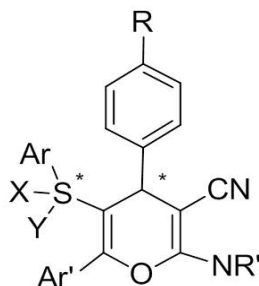


Figura 77. Estructura base para la elaboración de los antagonistas de receptores NK-1 ensayados durante esta tesis.

### 6.11.1. Evaluación de la actividad anticancerosa de una nueva serie de antagonistas del receptor NK-1.

Puesto que el objetivo de esta tesis es la búsqueda de fármacos más selectivos en el tratamiento de cáncer de pulmón, el *screening* de estos nuevos antagonistas fue realizado mediante el ensayo de viabilidad celular MTT en células pulmonares: células cancerosas A549 y células no malignas MRC-5. Ambos tipos celulares fueron expuestos a distintas concentraciones de los antagonistas durante 48 h. Los resultados obtenidos son recogidos en las Figuras 78-80.

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

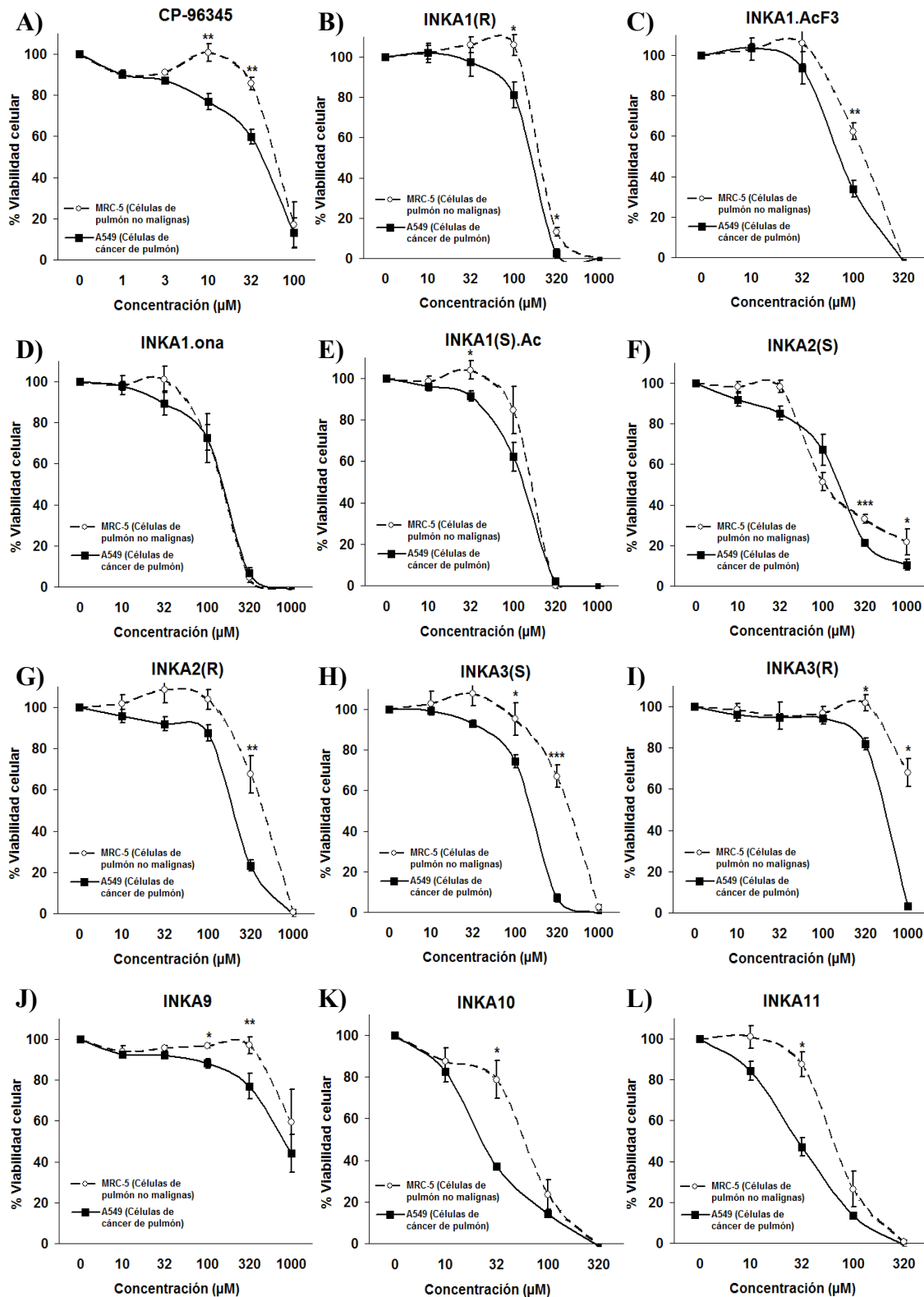


Figura 78. Actividad citotóxica mostrada por antagonistas del receptor NK-1. Células cancerosas A549 (-■-) y células no malignas MRC-5 (-○-) fueron tratadas durante 48 h y su viabilidad celular medida mediante el ensayo MTT.

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

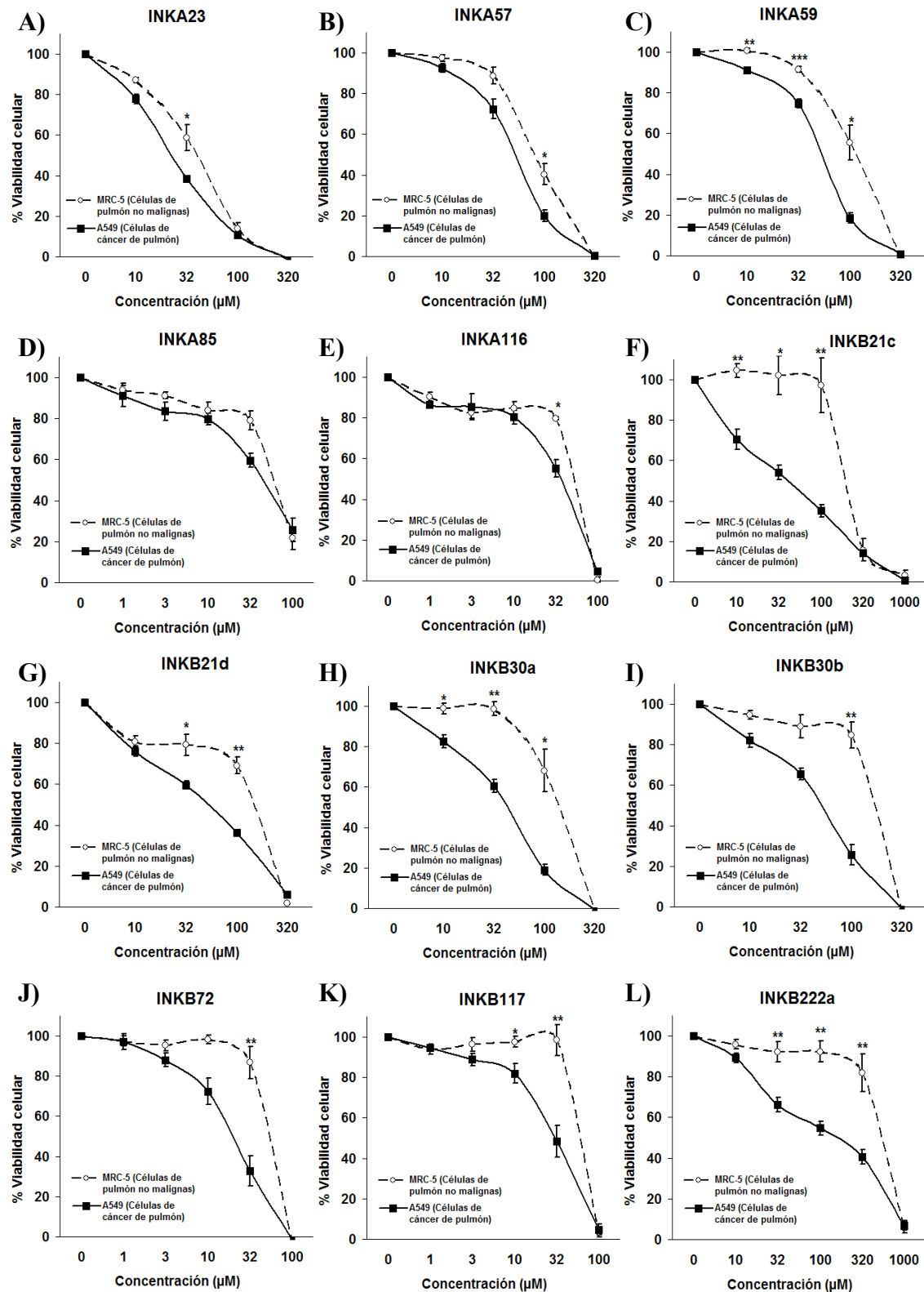


Figura 79. Actividad citotóxica mostrada por antagonistas del receptor NK-1. Células cancerosas A549 (-■-) y células no malignas MRC-5 (-○-) fueron tratadas durante 48 h y su viabilidad celular medida mediante el ensayo MTT.

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

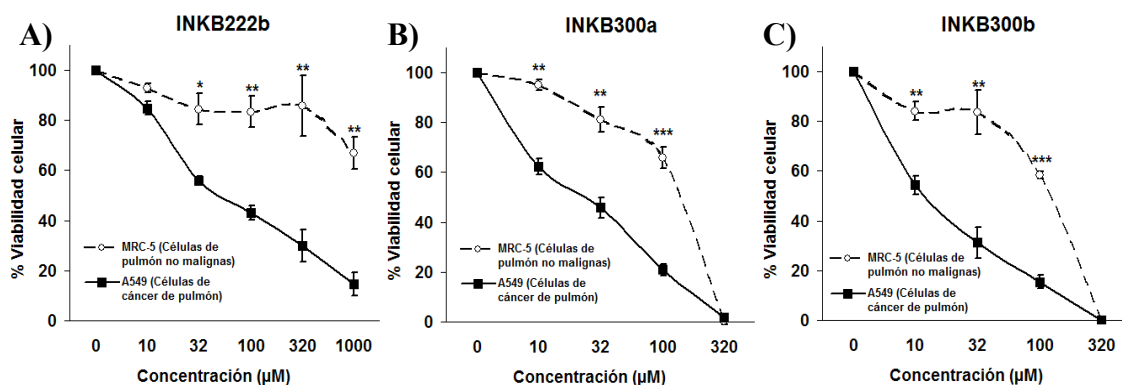


Figura 80. Actividad citotóxica mostrada por antagonistas del receptor NK-1. Células cancerosas A549 (■) y células no malignas MRC-5 (○) fueron tratadas durante 48 h y su viabilidad celular medida mediante el ensayo MTT.

Teniendo en cuenta las IC<sub>50</sub> para ambas líneas celulares (Tabla 18) y el perfil de la curva de viabilidad celular (Figuras 78-80) se pueden clasificar a los antagonistas de receptores NK-1 aquí ensayados en función de su actividad citotóxica selectiva frente a células cancerosas A549 en 4 categorías:

\* No selectivos: los compuestos INKA1(R) (Figura 78B), INKA1.ona (Figura 78D) e INKA2(S) (Figura 78F) no mostraron una mayor actividad citotóxica frente a células cancerosas que frente a células normales, por lo que fueron igual de citotóxicos para ambas líneas celulares. Cabe destacar que la citotoxicidad de estos compuestos fue menor que la del compuesto referencia CP-96345, siendo el compuesto INKA2(S) el que presentó menor actividad citotóxica.

\* Ligera selectividad: los compuestos INKA1.AcF3 (Figura 78C), INKA1(S).Ac (Figura 78E), INKA9 (Figura 78J), INKA23 (Figura 79A), INKA57 (Figura 79B), INKA85 (Figura 79D), INKA116 (Figura 79E) e INKB117 (Figura 79K) mostraron una ligera actividad citotóxica selectiva sobre células cancerosas, al igual que el compuesto referencia CP-96345. La actividad citotóxica sobre células cancerosas A549 de los compuestos INKA1.AcF3, INKA1(S).Ac, INKA9 e INKA57 fue menor que la actividad citotóxica del compuesto referencia CP-96345, destacando que el compuesto INKA9 fue el compuesto con la menor actividad citotóxica de todos los antagonistas testados. Los compuestos INKA23, INKA85, INKA116 e INKB117 mostraron una actividad citotóxica sobre células A549 similar al compuesto de referencia. El compuesto INKB117 fue el compuesto que presentó mayor actividad anticancerosa selectiva en este grupo de compuestos.



## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

\* Modesta selectividad: los compuestos INKA2(R) (Figura 78G), INKA3(R) (Figura 78I), INKA3(S) (Figura 78H), INKA10 (Figura 78K), INKA11 (Figura 78L), INKA59 (Figura 79C), INKB21d (Figura 79G) e INKB72 (Figura 79J) mostraron una modesta actividad anticancerosa selectiva frente a células cancerosas A549, siendo mayor que la selectividad demostrada por el compuesto referencia CP-96345. Sin embargo, la actividad citotóxica frente a células A549 de los compuestos INKA2(R), INKA3(R), INKA3(S), e INKB21d fue menor que la del compuesto de referencia, mientras que la citotoxicidad de los compuestos INKA10, INKA11 e INKB72 fue superior. El compuesto INKA59 demostró un perfil citotóxico frente a células A549 similar al del compuesto de referencia.

\* Notable selectividad: los compuestos INKB21c (Figura 79F), INKB30a (Figura 79H), INKB30b (Figura 79I), INKB222a (Figura 79L), INKB222b (Figura 80A), INKB300a (Figura 80B), e INKB300b (Figura 80C) mostraron una notable actividad citotóxica selectiva sobre células cancerosas, siendo bastante mayor que la selectividad observada para el compuesto referencia CP-96345. Al igual que ocurría con alguno de los compuestos del párrafo anterior, a pesar de la mayor selectividad demostrada por estos compuestos, los compuestos INKB21c, INKB30b, INKB222a e INKB222b presentaron una menor actividad citotóxica sobre células A549 que el compuesto de referencia. Sin embargo, los compuestos INKB30a, INKB300a e INKB300b presentaron mayor actividad citotóxica sobre células A549 que el compuesto de referencia.

Como se ha comentado anteriormente, datos recientes demuestran que las células cancerosas presentan mayores niveles de receptores NK-1 que las células normales<sup>198,200</sup>. Muñoz y cols<sup>200</sup> observaron que varias líneas celulares de cáncer de pulmón presentaban entre 30-60 veces mayores niveles de expresión del receptor NK-1 que células normales y que la activación de estos receptores era necesaria para la proliferación y viabilidad de estas células cancerosas. Esto puede explicar la mayor actividad citotóxica frente a células cancerosas de pulmón que frente a células normales demostrada por algunos de los antagonistas aquí testados. Sin embargo, la diferencia de selectividad demostrada entre los antagonistas ensayados hizo pensar que quizás estos compuestos también pudiesen inducir efectos citotóxicos selectivos por mecanismos distintos a la antagonización del receptor NK-1.

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Compuestos	IC50 (media $\pm$ SEM; $\mu$ M)		p
	MRC-5	A549	
CP-96345	57,9 $\pm$ 8,1	46,8 $\pm$ 8,9	-
INKA1(R)	204,5 $\pm$ 5,2	162,6 $\pm$ 8,8	*
INKA1.AcF3	130,2 $\pm$ 6,4	76,5 $\pm$ 6,5	*
INKA1.ona	140,4 $\pm$ 20,6	148,3 $\pm$ 12,9	-
INKA1(S).Ac	136,2 $\pm$ 16,2	107,7 $\pm$ 11,5	-
INKA2(S)	112,1 $\pm$ 17,1	136,5 $\pm$ 21,9	-
INKA2(R)	424,7 $\pm$ 55,1	195,6 $\pm$ 2,3	-
INKA3(S)	429,7 $\pm$ 29,8	156,4 $\pm$ 2,1	**
INKA3(R)	> 1000	507,8 $\pm$ 12,8	-
INKA9	824,6 $\pm$ 181,2	536,2 $\pm$ 31,4	-
INKA10	58,3 $\pm$ 6,5	22,7 $\pm$ 0,7	*
INKA.11	67,4 $\pm$ 6,3	29,4 $\pm$ 3,9	**
INKA.23	44,3 $\pm$ 4,4	23,6 $\pm$ 1,3	*
INKA.57	82,9 $\pm$ 6,9	52,0 $\pm$ 4,1	*
INKA.59	112,5 $\pm$ 15,4	53,1 $\pm$ 2,3	*
INKA.85	59,9 $\pm$ 3,7	49,7 $\pm$ 7,1	-
INKA.116	48,9 $\pm$ 0,4	35,0 $\pm$ 3,5	*
INKB21c	192,2 $\pm$ 27,9	42,9 $\pm$ 9,2	**
INKB21d	134,4 $\pm$ 8,7	49,9 $\pm$ 3,0	*
INKB30a	131,6 $\pm$ 16,8	42,7 $\pm$ 3,5	*
INKB30b	159,7 $\pm$ 8,7	50,6 $\pm$ 5,3	**
INKB72	50,4 $\pm$ 3,3	20,8 $\pm$ 4,0	**
INKB117	56,2 $\pm$ 2,4	31,4 $\pm$ 5,6	**
INKB222a	501,0 $\pm$ 62,0	133,5 $\pm$ 35,2	*
INKB222Bb	> 1000	59,3 $\pm$ 11,0	-
INKB300a	141,2 $\pm$ 1,8	28,0 $\pm$ 6,9	**
INKB300b	120,1 $\pm$ 3,5	19,3 $\pm$ 7,9	**

Tabla 18. Valores de IC50 de los antagonistas del receptor NK-1 evaluados.

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### *6.11.2. Implicación de otros mecanismos en la actividad anticancerosa de una nueva serie de antagonistas del receptor NK-1.*

La generación de EROs y la inhibición de la glicólisis son posibles mecanismos de selectividad anticancerosa<sup>25</sup>. Para comprobar si los antagonistas del receptor NK-1 pueden inducir la generación de EROs y/o la inhibición de la glicólisis como efectos citotóxicos, se escogió el compuesto INKB300b para la realización de los experimentos. Se escogió este compuesto debido a que destacó sobre los demás antagonistas por ser el que presentó mejor relación selectividad/citotoxicidad, con un valor de IC50 que fue 6 veces menor para células cancerosas que para las células no malignas.

Para valorar si la formación de EROs estaba involucrada en el efecto citotóxico de INKB300b, células A549 fueron expuestas a este antagonista en presencia o ausencia de antioxidantes (MnTMPyP, NAC y catalasa) durante 48 h (Figura 81). La viabilidad celular fue medida mediante el ensayo MTT. Ninguno de los antioxidantes redujo la citotoxicidad de INKB300b, lo que sugiere que la generación de EROs no está involucrada en el mecanismo citotóxico de este compuesto.

La evaluación de la capacidad de inhibir la glicólisis por INKB300b fue realizada mediante la medición de los niveles de glucosa (producto inicial de la glicólisis) y lactato (producto final de la glicólisis) en células A549 que fueron expuestas 8 h a 32  $\mu$ M de INKB300b. Como control positivo se utilizó el inhibidor de la glicólisis dicloroacetato. INKB300b no demostró actuar inhibiendo la glicólisis, como se puede observar en la Figura 81.

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

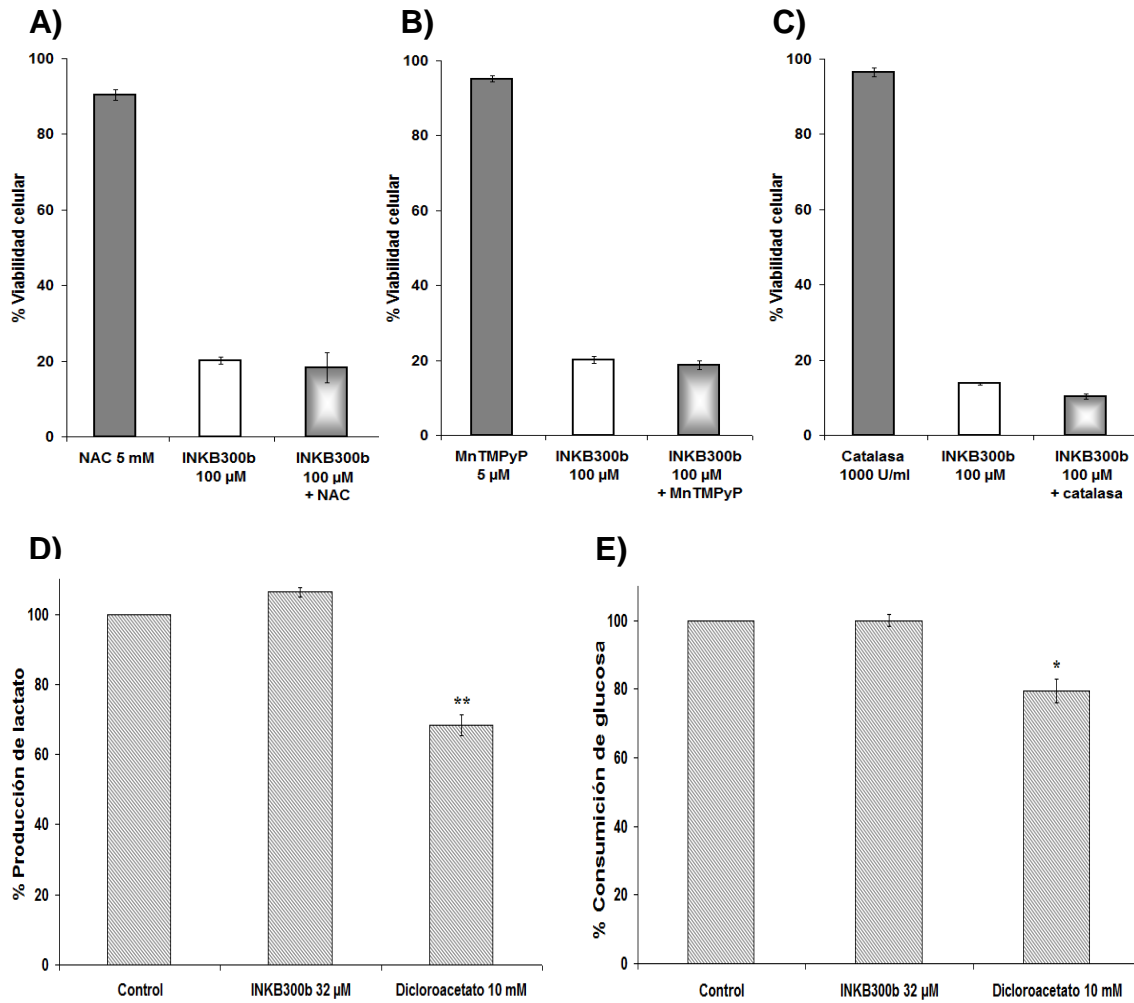


Figura 81. Papel de la generación de EROs y la inhibición de la glicólisis en el mecanismo de citotoxicidad del antagonista del receptor NK-1 INKB300b. Células A549 fueron expuestas al compuesto INKB300b durante 48 h en presencia o ausencia del mimético superóxido dismutasa MnTMPyP (A), de catalasa (B) y de n-acetilcisteína (NAC) (C), los cuales fueron añadidos una hora antes al INKB300b. Ninguno de los antioxidantes demostró disminuir el efecto citotóxico del compuesto INKB300b. D) Porcentaje de producción y E) porcentaje de consumo de glucosa en células A549 expuestas 8 h al INKB300b y dicloroacetato (control positivo) en relación a las células no tratadas.

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Por otra parte, se sabe que el bloqueo de los receptores NK-1 induce la inhibición de la proliferación celular y de la síntesis de ADN a través de la vía MAPK<sup>197</sup>. La inhibición de la síntesis de ADN es uno de los mecanismos de acción más comunes entre los fármacos antitumorales utilizados en clínica, como los antimetabolitos. Esta inhibición de la síntesis de ADN puede inducir paradas de la horquilla de replicación que pueden acabar desencadenando daño en el ADN. En condiciones normales este daño suele ser reparado por la Recombinación Homóloga (HR)<sup>202</sup>. Sin embargo, se sabe que ciertos tipos de tumores son defectuosos en esta vía de reparación, haciéndolos más sensibles a este tipo de fármacos<sup>24</sup>. Estos datos sugieren que la inhibición de la síntesis de ADN por el bloqueo de los receptores NK-1 podría estar desencadenando daño en el ADN en cuya reparación estaría involucrada la HR. Para comprobar esta posibilidad, células VC8 (células con HR no funcional debido a que presentan mutaciones de la proteína BRCA2) y células VC8B2 (células con HR funcional) fueron tratadas con diferentes concentraciones de este antagonista del receptor NK-1 durante 24 horas. Transcurrido ese tiempo, las células se incubaron libres del compuesto durante 48 horas para permitir la acción de la HR. Finalizado este tiempo, se cuantificó la viabilidad celular mediante el ensayo MTT (Figura 82). La viabilidad de células deficientes en HR se vio afectada en mayor medida que la viabilidad de células no deficientes en HR tras el tratamiento con INKB300b. Los valores de IC<sub>50</sub> (media  $\pm$  SEM;  $\mu$ M) fueron  $63,7 \pm 11,1$  y  $36,5 \pm 4,9$  para células no deficientes VC8-B2 y células deficientes VC8, respectivamente. Estos datos sugieren que el bloqueo del receptor NK-1 por INKB300b desencadena daño en el ADN, en cuya reparación está involucrada la HR. Estos resultados sugieren que cánceres con deficiencias en HR podrían ser más sensibles a antagonistas del receptor NK-1 como el INKB300b. Por otro lado, para comprobar si otras vías de reparación estaban involucradas en la actividad citotóxica de INKB300b, células deficientes en BER, NER y NHEJ y sus respectivas células parentales (no deficientes) fueron tratadas con INKB300b en las mismas condiciones comentadas anteriormente. Ninguna de estas vías de reparación estuvo involucrada en la actividad de INKB300b (datos no mostrados).

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

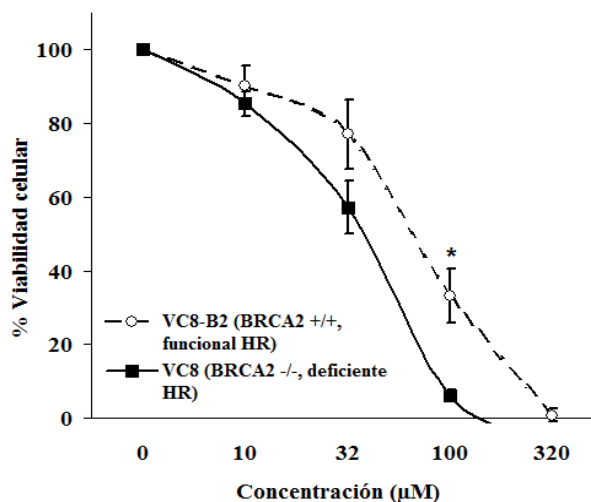


Figura 82. Evaluación del papel de la recombinación homóloga (HR) en la citotoxicidad del antagonista del receptor NK-1 INKB300b. Líneas deficientes en HR (VC8, -■-) y células no deficientes (VC8B2, -○-) fueron expuestas 24 h a distintas concentraciones de INKB300b. Posteriormente, se retiró el tratamiento y se permitió la recuperación durante 48 h. Finalmente, la viabilidad celular fue medida a través del ensayo MTT.

6.11.3. El antagonista del receptor NK-1 INKB300b muestra actividad anticancerosa selectiva frente a cáncer de mama y melanoma.

Finalmente, se evaluó si la selectividad mostrada por INKB300b en células de cáncer de pulmón también se observaba en otros tipos de células cancerosas. Mediante el ensayo MTT se evaluó la viabilidad celular de células cancerosas de mama MCF-7 y de melanoma UACC-62 frente a la viabilidad de células no malignas de mama MCF10 y piel VH10 tras un tratamiento de 48 h con INKB300b (Figura 83). Este compuesto también demostró mayor actividad citotóxica sobre células cancerosas de mama y melanoma que sobre células normales de mama y piel. Los valores de IC<sub>50</sub> (media ± SEM; µM) para células cancerosas de mama y melanoma fueron muy similares al obtenido sobre células cancerosas de pulmón, siendo  $23,9 \pm 5,0$ ;  $31,9 \pm 6,0$  y  $19,3 \pm 7,9$  para células cáncer de mama MCF7, células melanoma UACC-62 y células cáncer de pulmón A459 respectivamente. El valor de IC<sub>50</sub> (media ± SEM; µM) hacia células no malignas de piel VH10 fue muy similar al obtenido sobre células no malignas de pulmón MRC-5, siendo  $117,9 \pm 12,3$  y  $120,1 \pm 3,5$  respectivamente, mientras que las células no malignas de mama MCF10 mostraron mayor resistencia con unos valores de  $291,3 \pm 52,6$ . INKB300b también demostró mayor actividad citotóxica sobre células de melanoma que el control positivo 5-FU. Aunque en el caso de las células de cáncer de mama, INKB300b demostró menor actividad citotóxica que 5-FU, sin embargo, mostró mayor actividad selectiva que 5-FU, el cual no mostró selectividad (Tabla 19).

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

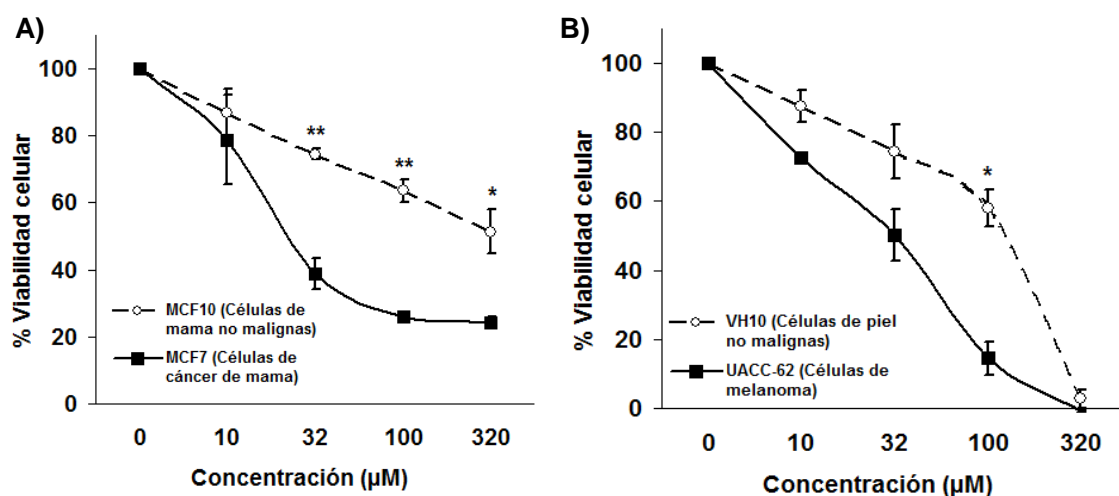


Figura 83. Células de cáncer de mama MCF7 y de melanoma UACC-62 son más sensibles que células normales de mama MCF10 y de piel VH10 al antagonista del receptor NK-1 INKB300b. Porcentaje de viabilidad celular (media  $\pm$  SEM) en MCF10 y MCF7 (A) y VH10 y UACC-62 (B) tras la exposición al INKB300b por 48 horas (ensayo MTT).

Compuesto	IC50 (media $\pm$ SEM; $\mu$ M)					
	MCF10	MCF7	p	VH-10	UACC62	p
INKB300b	291,3 $\pm$ 52,6	23,9 $\pm$ 5,0	*	117,9 $\pm$ 12,3	31,9 $\pm$ 6,0	*
5-FU	<0,1	0,1 $\pm$ 0	-	>1000	196 $\pm$ 190	-

Tabla 19. Valores de IC50 (media  $\pm$  SEM;  $\mu$ M) de las diferentes líneas celulares tras 48 h de exposición al antagonista del receptor NK-1 INKB300b.

En conclusión, los antagonistas de receptores NK-1 aquí evaluados han demostrado actividad anticancerosa selectiva frente a células de adenocarcinoma de pulmón. El compuesto con mayor selectividad, el INKB300b, también demostró actividad citotóxica selectiva frente a células de cáncer de mama y células de melanoma. Esta citotoxicidad de INKB300b podría verse potenciada en aquellos tumores con defectos en la vía de reparación de recombinación homóloga.



## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 6.12. OTROS.

Una de las estrategias seguidas para la búsqueda de nuevos fármacos anticancerosos selectivos ha sido la realización de un cribado de compuestos de naturaleza muy distinta entre sí. En este cribado se han incluido tanto compuestos naturales como compuestos sintéticos.

#### 6.12.1. Cribado de agentes prooxidantes.

Anteriormente fue discutido que una de las estrategias seleccionadas durante esta tesis para la búsqueda de nuevos fármacos anticancerosos selectivos fue la utilización de agentes prooxidantes. La posible selectividad de estos compuestos sobre células cancerosas se debe a que éstas presentan unos niveles basales de estrés oxidativo más elevados que las células normales. Un aporte exógeno específico de EROs a través de estos agentes prooxidantes puede conducir a un aumento del estrés oxidativo en las células cancerosas hasta niveles citotóxicos sin que las células normales se vean afectadas<sup>33,36</sup>. En los apartados anteriores, agentes prooxidantes como el ácido clorogénico, el HTY (y sus derivados sintéticos) y el pirogalol (y moléculas que lo contienen en su estructura) han demostrado poseer actividad anticancerosa selectiva sobre células cancerosas de pulmón A549 debido a su capacidad de generar EROs. Otros compuestos estudiados durante esta tesis (como heterósidos cardiotónicos) al igual que fármacos anticancerosos utilizados en clínica (como el paclitaxel) han demostrado que en su actividad citotóxica puede estar involucrada la formación de EROs<sup>72,203</sup>.

Al inicio de este trabajo, se comentó que durante esta tesis se ha colaborado en la realización de una revisión de los productos naturales con actividad prooxidantes que han demostrado actividad anticancerosa<sup>72</sup>. Con ayuda de esta revisión se escogieron una serie de compuestos prooxidantes para la evaluación de su posible actividad anticancerosa selectiva. Para la realización de este cribado o *screening*, células cancerosas de pulmón A549 y células no malignas de pulmón MRC-5 fueron expuestas bajo las mismas condiciones a varias concentraciones de los compuestos ensayados durante 48 horas. Tras el tiempo de exposición, la cuantificación de la viabilidad celular se llevó a cabo mediante el ensayo colorimétrico MTT. En este cribado se evaluó la actividad de compuestos prooxidantes conocidos, como la curcumina o el ácido ascórbico (Figura 84), y de nuevos compuestos, ya sean sintéticos o aislados por primera vez de la naturaleza. Los nuevos compuestos sintéticos fueron una serie de compuestos derivados del sulforafano que fueron sintetizados por el grupo de investigación de la Dra. Inmaculada Fernández Fernández del Dr. Noureddine Khier. Los nuevos compuestos de origen natural fueron una serie de nuevas moléculas terpénicas aisladas de distintas especies de plantas y algas. La evaluación de la posible actividad anticancerosa de estos nuevos compuestos

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

terpénicos fue fruto de la colaboración con el grupo de la Dra. Virginia Motilva del departamento de farmacología de la facultad de farmacia de la Universidad de Sevilla. En total fueron evaluados 16 nuevos compuestos terpénicos. Los resultados de estos compuestos terpénicos no se encuentran reflejados en esta tesis debido a que tanto su estructura como actividad biológica se encuentran en procesos de patente.

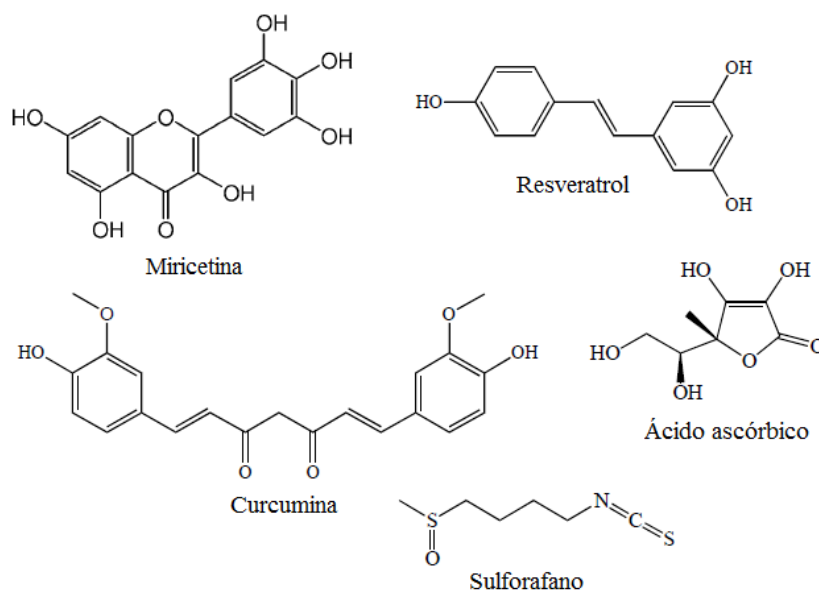


Figura 84. Estructura química de algunos de los compuestos prooxidantes ensayados.

Los resultados obtenidos durante el *screening* se encuentran recogidos en la Figura 85 y Tabla 20.

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

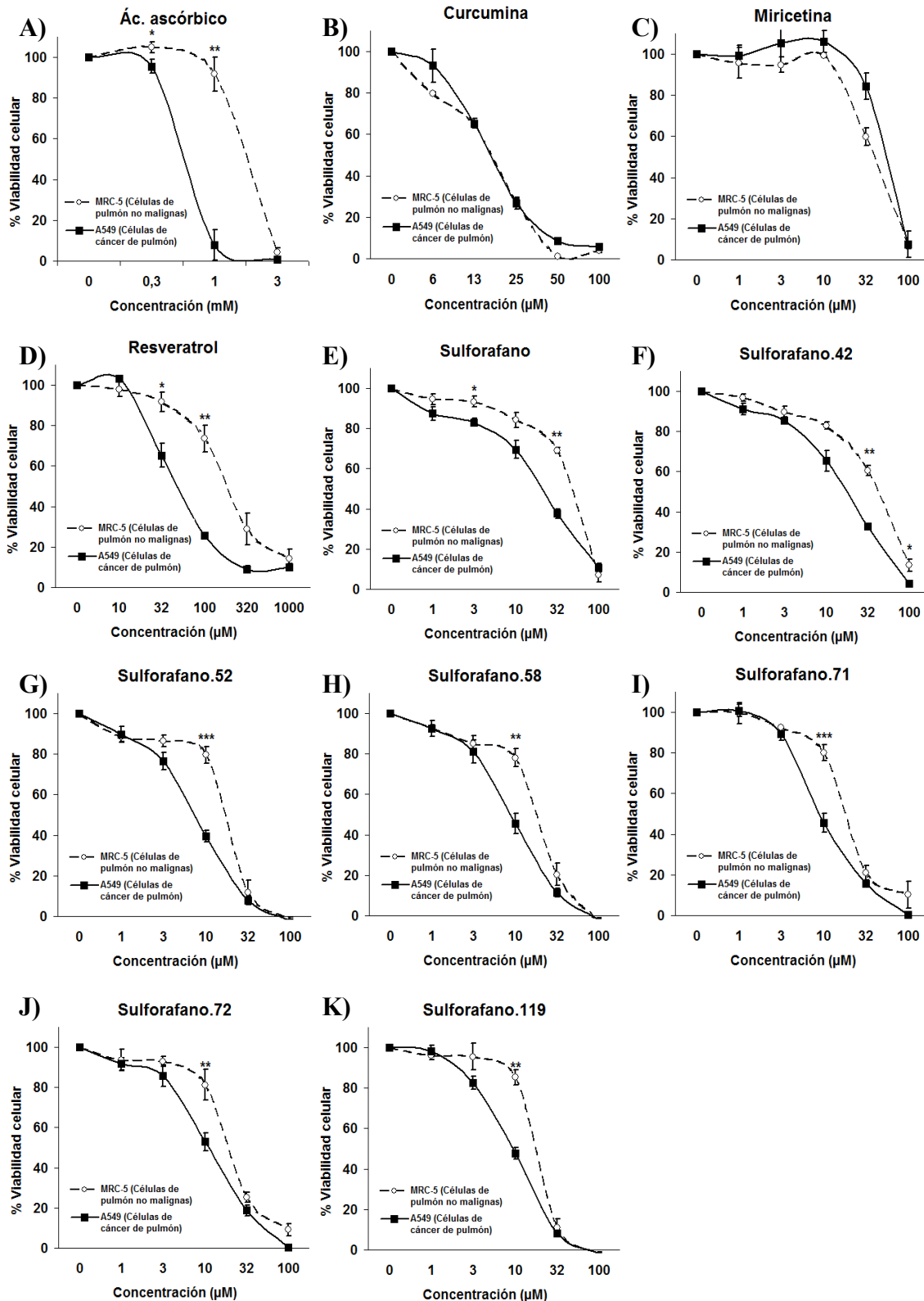


Figura 85. Screening de la actividad anticancerosa selectiva de una serie de compuestos prooxidantes. Células cancerosas A549 (-■-) y células normales MRC-5 (-○-) fueron expuestas a un rango de concentraciones de compuestos conocidos (A-E) y de una serie de nuevos derivados sintéticos del sulforafano (F-K) durante 48 h. La viabilidad celular fue medida mediante el ensayo MTT.

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La curcumina es un polifenol que se obtiene de la planta *Curcuma longa*. El rizoma pulverizado de esta planta es un ingrediente muy común en la cocina asiática y también es muy utilizado en la medicina tradicional asiática. En los últimos años, se ha empezado a valorar la posible actividad anticancerosa de la curcumina debido a su actividad prooxidante<sup>204-210</sup>. Sin embargo, durante el *screening* llevado a cabo durante esta tesis, curcumina no demostró tener actividad citotóxica selectiva, siendo igual de citotóxico para ambas líneas celulares (Figura 85B). Esta falta de citotoxicidad también fue observada por miricetina (Figura 85C), otro compuesto polifenólico que posee actividad prooxidante<sup>53,211</sup>.

Por otra parte, tanto el ácido ascórbico como resveratrol demostraron actividad citotóxica selectiva sobre células cancerosas A549 (Figuras 85A y 85D respectivamente). El ácido ascórbico o vitamina C es una vitamina hidrosoluble esencial en numerosas reacciones metabólicas y es uno de los principales antioxidantes presentes en la dieta. En los últimos años se le ha asociado actividad anticancerosa debido a su capacidad de generar estrés oxidativo<sup>35,212,213</sup>. Por este motivo, numerosos ensayos clínicos han sido iniciados para determinar la utilidad de esta vitamina en el tratamiento del cáncer, incluyendo estudios en cáncer de colon, mieloma múltiple y leucemias<sup>214,215</sup> (para más detalles: [www.clinicaltrials.gov](http://www.clinicaltrials.gov)). En el *screening* aquí realizado, vitamina C demostró ser más citotóxico frente a células de cáncer de pulmón que frente a células normales, siendo su IC50 aproximadamente 2,5 veces menor para células cancerosas que para células normales, destacando que a la concentración de 1 mM, la viabilidad celular de las células cancerosas fue del 10% mientras que la viabilidad de las células normales apenas se vio afectada. Cabe destacar que aunque esta selectividad se ha observado a concentraciones elevadas (1 mM) de vitamina C, estas concentraciones se pueden alcanzar en plasma cuando se administra de forma intravenosa<sup>213</sup>. Estos resultados sugieren que vitamina C podría ser útil en el tratamiento del cáncer de pulmón, pudiendo justificar su entrada en ensayos clínicos en este tipo de cáncer. Por otro lado, el resveratrol es un estilbenoide natural, que se encuentra en la uva y sus derivados, que en los últimos años tiene numerosas actividades biológicas<sup>216</sup>, incluyendo actividad antitumoral<sup>217-219</sup>. De hecho, existen varios ensayos clínicos con esta molécula para el tratamiento de cáncer colorrectal y mieloma múltiple (para más detalles: [www.clinicaltrials.gov](http://www.clinicaltrials.gov)). Esta posible actividad anticancerosa de resveratrol ha sido asociada a su capacidad de generar EROs<sup>217-219</sup>. Como ya se ha comentado, resveratrol demostró una actividad anticancerosa selectiva en el *screening* aquí realizado (Figura 85D), mostrando una IC50 para células cancerosas 4 veces menor que para células normales, posiblemente debida a su acción como agente prooxidante.

Finalmente, otra molécula cuya actividad anticancerosa fue evaluada en este screening fue el sulforafano, y una serie de derivados sintéticos de él, cuya síntesis fue realizada por el grupo de investigación de la Dr. Inmaculada Fernández Fernández<sup>51</sup>. El sulforafano es un compuesto

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

organosulfurado que se puede encontrar en las crucíferas, como el brócoli. Varios estudios han demostrado la actividad anticancerosa de este compuesto organosulfurado<sup>220-222</sup> y se encuentra en varios ensayos clínicos de cáncer de próstata y melanoma (para mayor detalle consultar: [www.clinicaltrials.gov](http://www.clinicaltrials.gov)). Uno de sus posibles mecanismos de acción es la generación de EROs<sup>221</sup> y por ese motivo fue incluido en este *screening*. Aunque sulforafano demostró tener actividad citotóxica selectiva sobre células cancerosas de pulmón, esta selectividad fue menor que la mostrada por resveratrol y vitamina C (Figura 85). Los derivados sintéticos de sulforafano (Figuras 85F-85K) demostraron mayor actividad citotóxica que sulforafano, a excepción del compuesto nombrado como sulforafano.42 que mostró la misma actividad. Sin embargo, estos derivados fueron menos selectivos que sulforafano, a excepción de los compuestos sulforafano.42 y sulforafano.52 que mostraron una actividad anticancerosa selectiva similar a la del sulforafano.

Compuesto	IC50 (media $\pm$ SEM; $\mu$ M)		p
	MRC-5	A549	
Ác. Ascórbico	1700,0 $\pm$ 100,0	700,0 $\pm$ 100,0	*
Curcumina	16,4 $\pm$ 0,3	16,5 $\pm$ 0,7	-
Miricetina	38,7 $\pm$ 3,1	53,6 $\pm$ 5,1	-
Resveratrol	209,0 $\pm$ 37,9	48,1 $\pm$ 5,9	*
Sulforafano	46,6 $\pm$ 2,2	19,6 $\pm$ 2,3	**
Sulforafano.42	40,8 $\pm$ 2,0	19,8 $\pm$ 0,1	**
Sulforafano.52	17,6 $\pm$ 1,4	7,5 $\pm$ 0,8	**
Sulforafano.58	16,9 $\pm$ 0,4	10,1 $\pm$ 1,7	*
Sulforafano.71	18,5 $\pm$ 0,8	9,6 $\pm$ 1,3	**
Sulforafano.72	20,3 $\pm$ 0,4	12,0 $\pm$ 1,5	*
Sulforafano.119	17,4 $\pm$ 0,4	9,8 $\pm$ 0,6	***

Tabla 20. Valores de IC50 (media  $\pm$  SEM;  $\mu$ M) obtenidos del screening de agentes prooxidantes mediante el ensayo MTT.

En conclusión, los compuestos prooxidantes ácido ascórbico, resveratrol, sulforafano y una serie de derivados sintéticos de sulforafano mostraron mayor citotoxicidad hacia células cancerosas de pulmón A549 que hacia células normales de pulmón MRC-5. El resveratrol fue el compuesto que presentó la mayor actividad anticancerosa selectiva. Para confirmar la actividad anticancerosa de resveratrol es necesario realizar estudios *in vivo*.

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 6.12.2. Análogos de glicoglicerolípidos y derivados de urea.

En colaboración con el Departamento de Química Orgánica de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Sevilla, durante esta tesis se ha realizado un cribado o *screening* de la actividad anticancerosa de una nueva serie de compuestos químicos derivados de glicoglicerolípidos y de urea. Los glicoglicerolípidos son una clase de glicolípidos que forman parte de las membranas celulares vegetales y de la pared celular de bacterias. Consisten en la unión de uno o más monosacáridos y ácidos grasos a través de una molécula de glicerol. Numerosos glicoglicerolípidos tienen actividad farmacológica, incluyendo actividad antirretroviral, antiinflamatoria y antitumoral<sup>50,223,224</sup>. Por otra parte, compuestos químicos con grupos urea o tiourea han sido descritos con aplicación como insecticidas, antitumorales, antimicrobianos y antifúngicos<sup>48</sup>.

Para evaluar la posible actividad anticancerosa de 6 nuevos análogos glicoglicerolípidos<sup>50</sup> y 5 nuevos derivados de urea<sup>48</sup>, se realizó un *screening* de estas moléculas mediante el ensayo de viabilidad celular MTT. Células normales MRC-5 y células cancerosas A549 fueron expuestas a diferentes concentraciones de estos compuestos durante 48 horas, tras las cuales se realizó el ensayo MTT (Figura 86 y Tabla 21).

Los resultados obtenidos con los derivados glicoglicerolípidos se encuentran publicados en el artículo *Stereoselective Dihydroxylation Reaction of Alkenyl  $\beta$ -D-Hexopyranosides: A Methodology for the Synthesis of Glycosylglycerol Derivatives and 1-OAcyl-3-O- $\beta$ -D-glycosyl-sn-glycerol Analogues*, en la revista *European Journal of Organic Chemistry* (2012)<sup>50</sup>. De estos glicoglicerolípidos ensayados, los compuestos 59 y 63 demostraron el mismo efecto citotóxico sobre ambas líneas celulares (Figuras 86D y 86F, respectivamente). Sin embargo, el compuesto 60, que solamente se diferencia de estos dos compuestos en la presencia de un grupo oleil, sí que presentó una ligera actividad citotóxica selectiva frente a células cancerosas, aunque su citotoxicidad fue menor (Figura 86E). El análogo glicoglicerolípidos 58 demostró una ligera actividad citotóxica que fue ligeramente mayor frente a células cancerosas que frente a células normales (Figura 86C). También fueron evaluados dos análogos de glicoglicerol, compuestos 27 y 36 (Figuras 86A y 86B, respectivamente). El compuesto 27 fue el compuesto con mayor actividad anticancerosa selectiva de estos análogos ensayados, mientras que el compuesto 36 apenas demostró tener actividad citotóxica en ninguna de las líneas ensayadas.

De los derivados de urea<sup>48</sup>, ninguno demostró tener actividad citotóxica selectiva sobre células cancerosas, demostrando igual citotoxicidad sobre ambas líneas celulares (Figuras 86G-86K). Sin embargo, su actividad citotóxica fue mayor que la demostrada por los análogos glicoglicerolípidos comentados en el párrafo anterior.

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

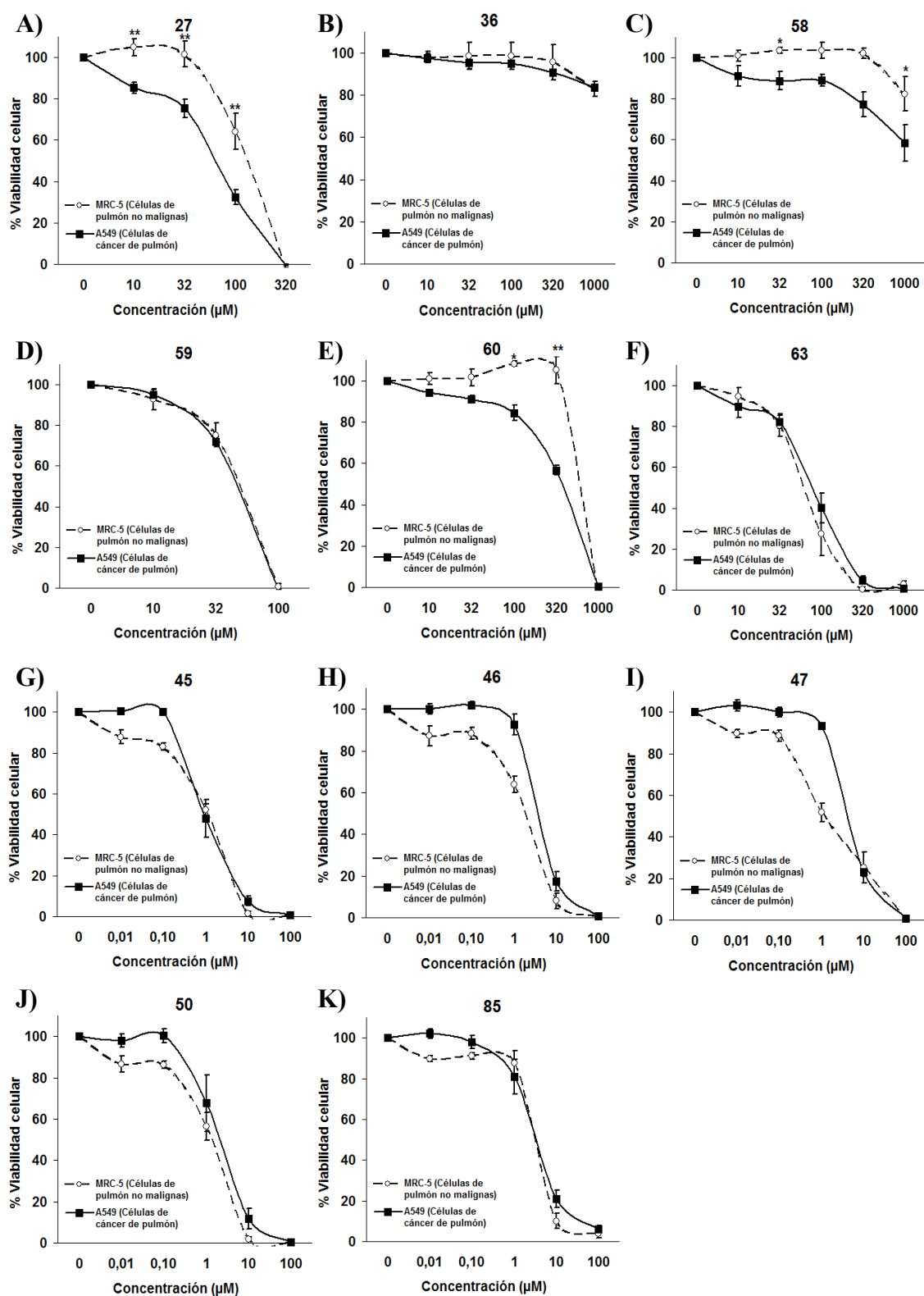


Figura 86. Porcentaje de viabilidad celular de células A549 y MRC-5 expuestas a una serie de nuevos glicolípidos y derivados de ureas.



## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Compuesto		IC50 (media $\pm$ SEM; $\mu$ M)	
		MRC-5	A549
Derivados glicerolípidos	27	125,9 $\pm$ 15,1	63,58 $\pm$ 6,4
	36	-	-
	58	-	-
	59	46,6 $\pm$ 2,7	44,8 $\pm$ 1,3
	60	573,8 $\pm$ 13,9	362,0 $\pm$ 14,4
	63	66,8 $\pm$ 11,1	82,0 $\pm$ 14,5
Derivados de urea	45	1,2 $\pm$ 0,1	1,0 $\pm$ 0,3
	46	1,9 $\pm$ 0,3	4,0 $\pm$ 0,6
	47	2,0 $\pm$ 0,6	4,3 $\pm$ 0,2
	50	1,3 $\pm$ 0,1	2,7 $\pm$ 0,8
	85	3,1 $\pm$ 0,2	3,9 $\pm$ 0,3

Tabla 21. Valores de IC50 (media  $\pm$  SEM;  $\mu$ M) obtenidos mediante el ensayo MTT tras 48 h de exposición a los diferentes compuestos.

A excepción del compuesto 27, los análogos de glicoglicerolípidos y derivados de urea aquí evaluados no presentaron actividad anticancerosa selectiva, por lo que no tienen una posible utilidad en el tratamiento del cáncer de pulmón.

### 6.13. DISCUSIÓN GLOBAL.

El cáncer es una enfermedad con una gran tasa de mortalidad debido a que un porcentaje elevado de cánceres se diagnostican cuando células de un tumor primario ya se han diseminado a través de la sangre o la linfa a otros tejidos del organismo. La principal forma de tratamiento en esta fase de la enfermedad es la quimioterapia, que consiste en administrar fármacos de forma sistémica con el objetivo de que alcancen y maten a las células tumorales. Pero la gran mayoría de estos fármacos son tóxicos tanto para las células tumorales como para las células sanas, lo que causa una alta toxicidad en el paciente y hace necesario reducir las dosis de estos fármacos a niveles que son poco efectivos<sup>8,10,12</sup>. Esta falta de selectividad de los fármacos anticancerosos hace que generalmente no se puedan alcanzar las concentraciones necesarias para conseguir la erradicación completa de las células cancerosas. Por ejemplo, el cisplatino es un fármaco anticanceroso utilizado en el tratamiento de numerosos tipos de cáncer, como el de pulmón y el de mama. Cisplatino se administra por vía intravenosa, alcanzándose concentraciones plasmáticas en el rango 10-50  $\mu$ M<sup>225,226</sup>. En la Figura I del Anexo I (datos obtenidos con el ensayo *in vitro* MTT) puede observarse que cisplatino, en ese rango de concentraciones, disminuye la viabilidad de células cancerosas de pulmón y mama hasta aproximadamente un 20-40%, pero también la de células no cancerosas hasta aproximadamente

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

un 40-60%. Este ejemplo muestra la poca selectividad de los fármacos antineoplásicos actuales, principal responsable de que el cáncer siga siendo un problema grave de salud sin resolver. El objetivo principal de esta tesis ha sido contribuir a la búsqueda de fármacos anticancerosos selectivos utilizando posibles estrategias que exploten los defectos en la reparación del daño en el ADN y las alteraciones metabólicas de las células cancerosas. Tras un análisis bibliográfico se seleccionaron más de 100 compuestos, y su posible actividad anticancerosa selectiva se ensayó en células cancerosas de pulmón y células no cancerosas de pulmón. Posteriormente se evaluaron posibles mecanismos implicados en la selectividad de los compuestos más activos y, finalmente, se utilizaron células cancerosas y no cancerosas de otros tejidos para confirmar la selectividad anticancerosa de los compuestos más prometedores.

Una de las estrategias estuvo basada en la utilización de los defectos en los mecanismos de reparación del daño en el ADN para el tratamiento del cáncer de pulmón. Se sabe que determinados tipos de cáncer presentan defectos en algunas de las proteínas involucradas en los mecanismos de reparación del daño en el ADN<sup>24,84</sup>. Estos defectos hacen a estos tumores más sensibles a daños específicos en el ADN al no ser capaz de repararlos. Fármacos anticancerosos que generan daño en el ADN son más citotóxicos en células que presentan defectos en algunas de estas vías reparación. El cisplatino es un buen ejemplo de ello. Este fármaco actúa generando aductos en el ADN que son reparados por la vía NER. Se sabe que existen cánceres de pulmón que presentan defectos en alguna de las proteínas de NER, siendo éstos más sensibles al efecto de cisplatino<sup>84,227</sup>. Cisplatino no es el único caso. De hecho, en esta tesis se ha realizado una revisión bibliográfica que muestra que la actividad citotóxica de más de 60 fármacos antineoplásicos utilizados en clínica se altera cuando existían deficiencias en específicas proteínas reparadoras del ADN (ver revisión en Antecedentes). Esto ha hecho que en los últimos años se empiecen a considerar los defectos en las proteínas implicadas en las vías de reparación del daño en el ADN como importantes dianas terapéuticas anticancerosas.

Estudios clínicos han demostrado que existen tipos de cáncer de pulmón que presentan defectos en los mecanismos de reparación de las rutas NER, BER, HR, NHEJ o FA<sup>24,84</sup>. Estos tumores serían más sensibles a fármacos cuyo daño producido en el ADN solamente pudiese ser reparado por este tipo de mecanismos, mientras que las células normales no se verían afectadas al tener los mecanismos de reparación funcionales<sup>15,24,84</sup>. Esta posible selectividad anticancerosa basada en los defectos en los mecanismos de reparación ha sido utilizada en esta tesis para la búsqueda de fármacos selectivos. De los compuestos que demostraron actividad anticancerosa selectiva, se estudió la implicación de los mecanismos de reparación de aquellos que presentaron capacidad para generar daño en el ADN. Tanto fenilglioxal (FG) como los derivados galactopiranósidos 22 y 35 fueron más citotóxicos en células deficientes en NER, por lo que la actividad anticancerosa selectiva de estos compuestos podría ser mayor en el caso de

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

cánceres con deficiencias en NER. FG también demostró mayor actividad citotóxica sobre células deficientes en las vías NHEJ y HR, al igual que el agente prooxidante pirogalol, por lo que cánceres deficientes en estas vías podrían ser más sensibles a estos compuestos. Estos compuestos no fueron los únicos que demostraron mayor citotoxicidad sobre células deficientes en HR, sino que el extracto de *Nerium oleander*, las lactonas  $\alpha,\beta$  insaturadas (2-furanona y 2-pirona) y el nuevo antagonista del receptor NK-1 INKB300b también demostraron mayor citotoxicidad sobre líneas deficientes en esta ruta de reparación. El papel de HR en la reparación del daño inducido por estos compuestos sugiere que cánceres con defectos en esta vía podrían ser más sensibles al efecto de estos compuestos. Únicamente el compuesto dodecil hidroxitirosil éter demostró mayor actividad citotóxica sobre líneas deficientes en BER, por lo que este compuesto podría ser útil en cánceres de pulmón deficiente en esta ruta de reparación del daño en el ADN. Es necesario realizar más estudios para poder confirmar que las deficiencias en estas vías aumentarían la selectividad de estos compuestos sobre células cancerosas. Estos estudios se han contemplado para la continuación del trabajo defendido en esta tesis. Células de cáncer de pulmón A549 serían transfectadas con siARN para el silenciamiento de los genes que codifican las proteínas que participan en las vías de reparación comentadas anteriormente. De esta manera, se podrá ver cómo se ve influenciada la actividad citotóxica de los compuestos comentados anteriormente sobre células cancerosas de pulmón deficientes en las vías de reparación.

Otra de las estrategias utilizadas en la búsqueda de nuevos fármacos anticancerosos selectivos fue la generación de estrés oxidativo mediante la utilización de agentes prooxidantes. Las células cancerosas poseen mayores niveles basales de especies reactivas de oxígeno (EROs) que las células normales<sup>36,37</sup>. Se piensa que un aporte exógeno específico de EROs podría elevar los niveles de estrés oxidativo hasta efectos citotóxicos en las células cancerosas, sin que las células normales se viesen afectadas<sup>33,35,36,72</sup>. De hecho, estudios recientes sugieren que las EROs participan en la actividad anticancerosa de muchos fármacos anticancerosos utilizados en clínica, como cisplatino, paclitaxel y doxorubicina<sup>72</sup>. Por este motivo, se ha empezado a estudiar la generación de estrés oxidativo como una nueva diana terapéutica. Esta generación de estrés oxidativo podría llevarse a cabo mediante la utilización de compuestos prooxidantes. Estos compuestos a bajas concentraciones suelen actuar como antioxidantes, pero a altas concentraciones son capaces de generar EROs como el peróxido de hidrógeno. En esta tesis se ha evaluado la posible actividad anticancerosa selectiva de varios agentes prooxidantes. En primer lugar, se comprobó si realmente células cancerosas de pulmón eran más sensibles a un aporte exógeno de EROs que células normales. En la Figura II del Anexo I se puede observar que las células cancerosas fueron más sensibles al tratamiento con peróxido de hidrógeno que las células normales. Posteriormente se evaluó la posible actividad anticancerosa de varios

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

compuestos prooxidantes. Estos compuestos fueron seleccionados con la ayuda de la revisión bibliográfica “Prooxidant natural products as anticancer agents” comentada e incluida en el apartado de Antecedentes. No todos los compuestos prooxidantes evaluados mostraron actividad citotóxica selectiva frente a las células cancerosas, lo que sugiere que el modo de generación de EROs es importante para la posible actividad anticancerosa selectiva. Por ejemplo, miricetina y ácido gálico son compuestos que generan EROs debido a la molécula de pirogalol que contienen en su estructura<sup>53</sup>. Sin embargo, miricetina no demostró actividad anticancerosa selectiva mientras que el ácido gálico sí presentó mayor actividad citotóxica frente a las células cancerosas. El ácido clorogénico (ACG), el hidroxitirosol (y sus derivados sintéticos) y el resveratrol demostraron una marcada selectividad citotóxica sobre células cancerosas de pulmón, que puede explicarse por su capacidad prooxidante. La generación de EROs también participó ligeramente en la citotoxicidad del extracto de *N. oleander* y la del heterósido cardiotónico oubaína. Aunque la generación de EROs por algunos de estos compuestos solamente se observó a concentraciones elevadas, estas concentraciones podrían alcanzarse mediante administración intravenosa. Un ejemplo es el caso de la vitamina C. Los resultados obtenidos en esta tesis muestran que la vitamina C posee una elevada actividad anticancerosa selectiva a la concentración de 1 mM; concentración que podría alcanzarse en plasma mediante infusión intravenosa<sup>213</sup>. Formulaciones galénicas, como la encapsulación del compuesto en micro- y nanopartículas, también podrían ayudar a alcanzar las concentraciones de los compuestos en el tumor. Por ejemplo, Lemarie y cols.<sup>228</sup> observaron que la administración intravenosa de epigallocatequina-3-galato encapsulada resultó en la supresión de tumores en un modelo animal de cáncer. Por otra parte, la potencia de estos compuestos prooxidantes podría aumentarse mediante modificaciones químicas, como han demostrado algunos de los derivados semisintéticos de hidroxitirosol evaluados en este trabajo. Algunos de éstos derivados generan EROs a concentraciones más bajas que las mostradas por hidroxitirosol, por lo que pueden ser más citotóxicos y selectivos. Estos datos sugieren que determinados compuestos prooxidante podrían tener utilidad para el tratamiento del cáncer de pulmón.

La tercera estrategia seguida en esta tesis estuvo basada en que las células cancerosas tienen una mayor dependencia de la glicólisis que las células normales<sup>25,26,29</sup>. Esta dependencia se debe a que las células cancerosas necesitan activar la glicólisis para el aporte de los elevados niveles de energía y de macromoléculas necesarios para poder mantener el elevado ritmo proliferativo que presentan estas células<sup>31</sup>. Se piensa que la inhibición de la glicólisis provocaría un cambio metabólico en las células cancerosas que no podrían soportar, mientras que las células normales se verían menos afectadas por su menor dependencia de esta ruta metabólica para su supervivencia. El cáncer de pulmón, al igual que otros cánceres, depende de la glicólisis mayoritariamente para el mantenimiento energético necesario para la supervivencia y la

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

proliferación<sup>32</sup>. Por este motivo, durante esta tesis se ha estudiado la posible utilidad de la inhibición de la glicólisis en el tratamiento del cáncer de pulmón. Por un lado, los heterósidos cardiotónicos y el extracto de *N. oleander* inhibieron la glicólisis de células cancerosas de pulmón. Por otro lado, tres inhibidores de glicólisis conocidos, dicloroacetato, 2-deoxiglucosa y bromopiruvato, no mostraron actividad citotóxica selectiva, siendo igual de citotóxicos para células normales como para células cancerosas de pulmón. Estas diferencias en actividad anticancerosa selectiva entre los heterósidos cardiotónicos y estos tres inhibidores de glicólisis ponen de manifiesto que la inhibición de la glicólisis puede no ser suficiente para poder generar actividad citotóxica selectiva frente a células cancerosas, o que el mecanismo de inhibición de la glicólisis sea importante para conseguir selectividad. Por otra parte, la glicólisis no solamente es necesaria para el aporte energético y de macromoléculas, sino que también juega un papel fundamental en el mantenimiento del estado redox de la célula. Como se ha comentado anteriormente, debido al elevado ritmo metabólico de las células cancerosas, éstas presentan elevados niveles de EROs. Para poder mantener estos niveles dentro de concentraciones no citotóxicas, las células cancerosas han desarrollado mecanismos de defensas, incluyendo la glicólisis. Por este motivo, se ha propuesto que la combinación de inhibidores de glicólisis junto con agentes prooxidantes podría producir un sinergismo citotóxico sobre células cancerosas<sup>25</sup>. Esta combinación de compuestos originaría un aporte exógeno de EROs (por los agentes prooxidantes) que no podría ser controlado al encontrarse inhibida la glicólisis (por los inhibidores de la glicólisis). Durante esta tesis también se ha evaluado la combinación de inhibidores de glicólisis y agentes prooxidantes. Aunque los inhibidores de la glicólisis dicloroacetato y 2-deoxiglucosa, no presentaron actividad anticancerosa selectiva sobre células de cáncer de pulmón, cuando fueron combinados con el agente prooxidante pirogalol, se produjo una potenciación de la actividad anticancerosa selectiva. El heterósido cardiotónico digitoxina, que actuó como un potente inhibidor de la glicólisis, también potenció el efecto citotóxico selectivo de los agentes prooxidantes vitamina C y pirogalol. Estos datos sugieren que la inhibición de la glicólisis puede potenciar la actividad anticancerosa selectiva de agentes prooxidantes.

Algunos de los compuestos que mostraron una elevada actividad anticancerosa selectiva fueron evaluados en combinación con fármacos anticancerosos utilizados en clínica. La combinación de fármacos anticancerosos es una de las herramientas más utilizadas para el tratamiento del cáncer. En esta combinación, es importante que los fármacos utilizados no presenten un efecto antagónico entre ellos. La combinación del derivado galactopiranosido 22, del dodecil hidroxitirosil éter o de los heterósidos cardiotónicos (digoxina, digitoxina y ouabaina) con un fármaco anticanceroso utilizado en clínica (cisplatino, oxaliplatino o 5-fluorouracilo) mostró un modesto efecto sinérgico sobre células cancerosas. Estos datos

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

sugieren que la combinación de estos compuestos con fármacos anticancerosos utilizados en clínica podría potenciar su efecto anticanceroso selectivo.

Finalmente, aquellos compuestos que mostraron mayor actividad anticancerosa selectiva en cáncer de pulmón fueron evaluados en otros tipos de cáncer. El compuesto aziridínico 22, el compuesto epóxido 35 y el antagonista del receptor NK-1 INKB300b también mostraron actividad anticancerosa selectiva en un modelo *in vitro* de cáncer de mama y melanoma. Por otra parte, los heterósidos cardiotónicos y el dodecil hidrotiroxil éter (HTDE) también mostraron mayor actividad citotóxica frente a células de cáncer de mama que frente a células normales. Es de destacar que el compuesto 22 y el HTDE presentaron una gran actividad citotóxica selectiva frente a células de cáncer de mama, siendo incluso mayor que la demostrada frente a células de cáncer pulmón, por lo que estos compuestos también podrían ser útiles en el tratamiento del cáncer de mama, que es el cáncer con mayores tasas de incidencia y mortalidad en mujeres<sup>10,13,131</sup>.

En conclusión, de los más de cien compuestos que fueron evaluados durante esta tesis, los compuestos que presentaron mayor actividad anticancerosa selectiva frente a células de cáncer de pulmón fueron una aziridina derivada de galactosa (compuesto 22), un epoxialquil galactopiranósido (compuesto 35), el ácido clorogénico, los heterósidos cardiotónicos (digitoxina, digoxina y ouabaína) y el antagonista del receptor NK-1 INKB300b. Estos compuestos también demostraron tener actividad anticancerosa selectiva frente a otros tipos de cáncer. La marcada selectividad anticancerosa mostrada por algunos de estos compuestos ensayados requiere confirmación en modelos animales de cáncer. Como continuación de esta tesis, se pretende evaluar la actividad de estos compuestos en dos modelos *in vivo* de cáncer de pulmón en ratones, un modelo de cáncer de pulmón inducido por uretano<sup>229-232</sup> y un modelo de metástasis pulmonar mediante la inyección de células cancerosas murinas<sup>233,234</sup>.

## **6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**



## **7. CONCLUSIONES**

## **7. CONCLUSIONES**

## **7. CONCLUSIONES**

### CONCLUSIONES

1. Se ha realizado un análisis bibliográfico de publicaciones que sugieren que es posible matar células tumorales de forma selectiva explotando sus defectos en la reparación del daño en el ADN y sus alteraciones metabólicas. Fruto de este análisis se seleccionaron más de 100 compuestos (o estrategias), y su posible actividad anticancerosa selectiva se ha ensayado en células cancerosas de pulmón (A549) y células no cancerosas de pulmón (MRC5). Posteriormente se ha evaluado la posible implicación de la inducción de daño en el ADN, de la inhibición de la glicólisis y de la capacidad de generar especies reactivas de oxígeno en la actividad anticancerosa de los compuestos más selectivos. Para confirmar la selectividad anticancerosa de estos compuestos, se han utilizado células cancerosas de mama (MCF7), piel (UACC62) y colon (HTC116) frente a células normales de mama (MCF10) y piel (VH10).

2. El epoxialquil galactopiranósido (2S,3S)-2,3-epoxidecil 4,6-O-(S)-bencilideno-β-D-galactopiranósido (compuesto 35) posee actividad anticancerosa selectiva frente a células cancerosas de pulmón. La generación de daño en el ADN participa en la citotoxicidad de este compuesto, y la ruta de reparación NER está involucrada en la reparación de dicho daño. Este compuesto también posee actividad anticancerosa selectiva sobre células cancerosas de mama y melanoma.

3. La aziridina derivada de galactosa 2-Metil-2,3-[N-(4-metilbencenosulfonil)imino]propil-2,3-di-O-bencil-4,6-O-(S)-bencilideno-β-D-galactopiranósido (compuesto 22) induce una marcada selectividad anticancerosa frente a células de cáncer de pulmón, mama y melanoma. La generación de daño en el ADN está involucrada en su efecto citotóxico, y la vía de reparación NER participa en la reparación de dicho daño. Es de destacar que las concentraciones de esta nueva aziridina requeridas para matar células de cáncer de mama fueron aproximadamente 50 veces inferiores a las necesarias para matar células normales de mama.

4. El compuesto dicarbonílico fenilglioxal muestra actividad anticancerosa selectiva sobre células cancerosas de pulmón. Esta actividad se debe, al menos en parte, a la generación de daño en el ADN y a la producción de peróxido de hidrógeno. Células deficientes en las vías de reparación NER, HR y NHEJ son más sensibles al efecto citotóxico de fenilglioxal que células no deficientes, lo que sugiere que tumores con defectos en estas vías de reparación pueden ser hipersensibles al efecto citotóxico de este compuesto.

5. Pirogalol, molécula presente en la estructura del compuesto mayoritario del té verde epigallocatequina-3-galato, mata células cancerosas de pulmón de forma selectiva. Esta citotoxicidad se debe fundamentalmente a su capacidad de generar peróxido de hidrógeno.

## 7. CONCLUSIONES

Pirogalol también induce roturas de doble cadena del ADN, en cuya reparación están involucradas las rutas HR, NHEJ y FA.

6. El constituyente del café ácido clorogénico induce un efecto citotóxico selectivo sobre células de cáncer de pulmón, genera daño en el ADN e induce la formación de complejos de rotura ADN-topoisomerasas. Estos efectos se deben principalmente a su capacidad de generar peróxido de hidrógeno.

7. Una nueva serie de derivados sintéticos del compuesto presente en el aceite de oliva hidroxitirosol muestra actividad anticancerosa selectiva sobre células cancerosas de pulmón. En la citotoxicidad del compuesto con mayor selectividad, dodecil hidroxitirosil éter, está involucrada la generación de especies reactivas de oxígeno y la inducción de daño en el ADN. La combinación de este compuesto con 5-fluorouracilo muestra un efecto sinérgico en células de cáncer de pulmón y antagónico en células normales de pulmón. Este derivado del hidroxitirosol también presenta actividad anticancerosa selectiva frente a células de cáncer de mama.

8. Los heterósidos cardiotónicos digitoxina, digoxina y ouabaína, y un extracto hidroalcohólico de las hojas de la planta rica en heterósidos cardiotónicos *Nerium oleander* L. (Apocinaceae) muestran una elevada selectividad frente a células cancerosas de pulmón e inducen una marcada inhibición de la glicólisis en estas células. También potencian la citotoxicidad de cisplatino en células de cáncer de pulmón al administrarse tras este fármaco anticanceroso. Cabe destacar que digitoxina inhibe el crecimiento de células cancerosas de pulmón a concentraciones más bajas que las presentes en el plasma de pacientes que utilizan este fármaco para el tratamiento de su enfermedad cardíaca.

9. Las lactonas  $\alpha,\beta$ -insaturadas 2-furanona y 2-pirona, presentes en la estructura de los heterósidos cardiotónicos, muestran actividad citotóxica selectiva sobre células de cáncer de pulmón. Estas lactonas generan daño en el ADN, en cuya reparación participa la ruta HR.

10. Del resto de compuestos ensayados destaca la actividad anticancerosa selectiva sobre células de cáncer de pulmón, mama y melanoma mostrada por el nuevo antagonista del receptor de neurokinina-1 denominado compuesto INKB300b.

11. Las conclusiones anteriores indican que es posible matar células cancerosas de forma selectiva explotando sus defectos en la reparación del daño en el ADN y sus alteraciones metabólicas. La marcada selectividad anticancerosa mostrada por algunos de los compuestos ensayados requiere confirmación en modelos animales de cáncer. La actividad anticancerosa selectiva de digitoxina en células de cáncer de pulmón a concentraciones terapéuticas apoya la posible realización de ensayos clínicos en pacientes con este tipo de cáncer.

### CONCLUSIONS

1. This work has analyzed the literature suggesting that cancer cells can be selectively killed by exploiting their DNA repair defects and their metabolic alterations. This analysis has been used to select over 100 compounds (and strategies), and their possible selective anticancer activity has been evaluated against lung cancer cells (A549) and lung non-malignant cells (MRC5). Then, it has been evaluated whether the most selective compounds induced DNA damage, inhibited glycolysis and generated reactive oxygen species. Compounds with a high selective cytotoxicity towards lung cancer cells have been also assessed against breast cancer cells (MCF7), melanoma cells (UACC62) and colon cancer cells (HTC116) *versus* breast normal cells (MCF10) and skin normal cells (VH10).

2. The epoxyalkenyl galactopyranoside (2S,3S)-2,3-epoxydecyl 4,6-O-(S)-benzylidene- $\beta$ -D-galactopyranoside (compound 35) induces selective cytotoxic activity against lung cancer cells, breast cancer cells and melanoma cells. This compound induces DNA damage, which may require a functional NER pathway for repair.

3. The new aziridine 2-methyl-2,3-[-(4-methylbenzenesulfonyl)imino]propyl 2,3-di-O-benzyl-4,6-O-(S)-benzylidene- $\beta$ -D-galactopyranoside (compound 22) induces a remarkable selective cytotoxic activity against lung cancer cells, breast cancer cells and melanoma cells, which may be mediated by its ability to induce DNA damage that requires NER for repair. It is worth noting that this aziridine kills breast cancer cells at concentrations 50-fold lower than those required to kill non-malignant breast cells.

4. The guanidine-reactive agent phenylglyoxal induces selective cytotoxicity against lung cancer cells. This activity is mediated, at least in part, by its ability to induce DNA damage and to generate hydrogen peroxide. Cells defective in the DNA repair pathways NER, HR and NHEJ are more sensitive than parental cells to the cytotoxic activity of phenylglyoxal. These data suggest that tumor cells with defects in these DNA repair pathways may be hypersensitive to the cytotoxic activity of phenylglyoxal.

5. Pyrogallol, a molecule present in the chemical structure of the major green tea constituent epigallocatechin-3-gallate, kills lung cancer cells selectively. This selective cytotoxicity is mainly mediated by its ability to generate hydrogen peroxide. Pyrogallol may also induce DNA double strand breaks that require HR, NHEJ and FA for repair.

6. The coffee constituent chlorogenic acid induces selective killing of lung cancer cells, generates cellular DNA damage and induces the formation of topoisomerases-DNA complexes in cells. These activities are largely mediated by its ability to generate hydrogen peroxide.

7. A new series of alkyl ether derivatives of the olive oil constituent hydroxytyrosol displays selective cytotoxicity against lung cancer cells. Hydroxytyrosyl dodecyl ether (HTDE),

## 7. CONCLUSIONES

the most selective derivative, can moderately inhibit glycolysis, induce oxidative stress and cause DNA damage in A549 cells. The combination of HTDE with the anticancer drug 5-fluorouracil induces a synergistic cytotoxicity in lung cancer cells but not in lung non-malignant cells. HTDE also displays selective cytotoxicity against breast cancer cells.

8. The cardiac glycosides digitoxin, digoxin and ouabain, and a hydroalcoholic extract from the leaves of the cardiac glycoside-containing plant *Nerium oleander* L. (Apocynaceae) display a high selective cytotoxicity towards lung cancer cells and induce a marked inhibition of glycolysis in these cells. These drugs also increase the cytotoxicity of cisplatin when administered after this commonly used anticancer agent. It is worth noting that digitoxin inhibits the growth of lung cancer cells at concentrations below those commonly found in the plasma of cardiac patients treated with this drug.

9. The alpha, beta-unsaturated lactones 2-furanone and 2-pyrone, which are present in the chemical structure of cardiac glycosides, induce selective cytotoxicity towards lung cancer cells. These lactones generate cellular DNA damage that requires HR for repair.

10. The selective cytotoxic activity of other compounds has been assessed; the high selective cytotoxicity against lung, melanoma and breast cancer cells shown by the new neurokinin 1 receptor antagonist INKB300b is worth noting.

11. The conclusions listed above support the idea that cancer cells can be killed selectively by exploiting their DNA repair defects and their metabolic alterations. The marked selective cytotoxicity displayed by some compounds towards cancer cells warrants further evaluation in animal models. The anticancer activity of digitoxin in lung cancer cells at therapeutic concentrations supports its possible advancement into clinical trials for the treatment of patients with lung cancer.

## **8. ABREVIATURAS.**

## **8. ABREVIATURAS**



## **8. ABREVIATURAS.**

## 8. ABREVIATURAS.

2-DG: 2-deoxiglucosa  
5-FU: 5-fluorouracilo  
ACG: ácido clorogénico  
ADN: ácido desoxirribonucleico  
AG: ácido gálico  
AMP: adenosín monofosfato  
AMPK: proteína quinasa activada por AMP (AMP-activated protein kinase)  
Antag.: antagonismo  
ATCC: American Type Culture Collection  
ATP: adenosín trifosfato  
BB: solución tampón de unión (*binding buffer*)  
BER: reparación por escisión de bases (Base Excision Repair)  
BrP: bromopiruvato  
BSA: albúmina de suero bovino (*bovine serum albumin*)  
CAT: ciclo de los ácidos tricarboxílicos o ciclo de Krebs  
Cat: catalasa  
CI: índice de combinación (combination index)  
Conc.: concentración  
CPCNP: cáncer de pulmón de células no pequeñas  
CPCP: cáncer de pulmón de células pequeñas  
Cpt: camptotecina  
DCA: dicloroacetato  
DMSO: dimetilsulfóxido  
DMEM: Dulbecco's modified Eagle's medium  
ECACC: European Collection of Cell Cultures  
EEUU: Estados Unidos  
EGCG: epigallocatequina-3-galato  
EGFR: receptor del factor de crecimiento epidérmico humano (*epidermal growth factor receptor*)  
ERO: especies reactivas de oxígeno  
Etop: etopósido  
FADH<sub>2</sub>: flavín adenín dinucleótido  
FG: fenilglioxal  
FITC: fluoresceína isotiocianato.  
H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: peróxido de hidrógeno  
HIF1: factor de transcripción inducible por hipoxia-1 (hypoxia-inducible factors)  
HR: recombinación homóloga (Homologous recombination)  
HTY: hidroxitirosol (hydroxytyrosol)  
HTDE: hidroxitiroxil dodecil éter  
NHEJ: reparación por unión de extremos no homólogos (non-homologous end joining)  
IC<sub>50</sub>: concentración inhibitoria (*inhibitor concentration 50*)  
IP: yoduro de propidio  
MAPK: proteína quinasa activada por mitógeno (*mitogen-activated protein kinases*)  
MMR: reparación de desapareamiento de bases (Mismatch repair)  
MnTMPyP: manganeso (III) tetrakis (1-metil-4-piridil) porfirina  
NAC: n-acetilcisteína  
NAD<sup>+</sup>: nicotinamida adenina dinucleótido en su forma oxidada  
NADH: nicotinamida adenina dinucleótido en su forma reducida  
NER: reparación por escisión de nucleótidos (Nucleotide Excision Repair)  
NK: neurokinina  
NOE: Extracto de *Nerium oleander* (*Nerium oleander extract*)  
OCT1: factor de transcripción unido a octámero (octamer-binding transcription factor)  
OXPHOS: fosforilación oxidativa (Oxidative phosphorylation)  
PBS: tampón fosfato salino (phosphate-buffered saline)  
PDH: piruvato deshidrogenasa

## 8. ABREVIATURAS.

PDK: piruvato deshidrogenasa kinasa  
PET: tomografía por emisión de positrones (positron emission tomography)  
PFK: fosfofructoquinasa (*phosphofructokinase*)  
PG: pirogalol  
PI3K: fosfoinositol 3-quinasa (phosphoinositida 3-kinase)  
RMN: resonancia magnética nuclear  
Sinerg.: sinergismo  
SEM: error estándar de la media (*standar error mean*)  
SGLT: cotransportador glucosa/Na<sup>+</sup> (*sodium-glucose transport protein*)  
SIDA: Síndrome de InmunoDeficiencia Adquirida  
SP: sustancia P  
SRB: sulforrodamina B  
TAC: tomografía computarizada  
TCA: ácido tricloroacético (*trichloroacetic acid*)  
Topo: topoisomerasa  
UV: ultravioleta  
VDAC: canales de aniones dependientes de voltaje (voltage dependent anion channels)

## **9. AGRADECIMIENTOS**

## **9. AGRADECIMIENTOS**

## **9. AGRADECIMIENTOS**

## **9. AGRADECIMIENTOS**



## **10. BIBLIOGRAFÍA**

## **10. BIBLIOGRAFÍA**

## **10. BIBLIOGRAFÍA**

## 10. BIBLIOGRAFÍA

### Reference List

- (1) Estapé J. Sección 8: oncología médica. In: Farreras Valenti P, ed. Medicina Interna.I. Barcelona: Ediciones Doyma, S.A; 1988:1077-1114.
- (2) National Cancer Institute (NCI). National Cancer Institute at the National Institutes of Health. Internet . 5-4-2012. 11-4-2012.  
Ref Type: Electronic Citation
- (3) Asociación española contra el cáncer (AECC). Asociación española contra el cáncer (AECC) . Internet . 21-4-2013. 11-4-2013.  
Ref Type: Electronic Citation
- (4) Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. Cell. 2011;144:646-674.
- (5) Gibbs WW. Untangling the roots of cancer. Sci Am. 2003;289:56-65.
- (6) Vogelstein B, Kinzler KW. Cancer genes and the pathways they control. Nat Med. 2004;10:789-799.
- (7) Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. Cell. 2000;100:57-70.
- (8) Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. GLOBOCAN 2008 v2.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase. Internet . 3-10-2012. 11-4-2013.  
Ref Type: Electronic Citation
- (9) World Health Organization. The global burden of disease: 2004 update. Internet . 2008.  
Ref Type: Electronic Citation
- (10) World Health Organization. Estadísticas sanitarias mundiales 2012. Internet . 2012.  
Ref Type: Electronic Citation
- (11) World Health Organization. The impact of chronic disease in Spain. Internet . 2002.  
Ref Type: Electronic Citation
- (12) Sociedad Española de Oncología Médica (SEOM). El cáncer en España.com. Internet . 2013.  
Ref Type: Electronic Citation
- (13) Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics, 2013. CA Cancer J Clin. 2013;63:11-30.

## 10. BIBLIOGRAFÍA

- (14) Luo J, Solimini NL, Elledge SJ. Principles of cancer therapy: oncogene and non-oncogene addiction. *Cell*. 2009;136:823-837.
- (15) Helleday T, Petermann E, Lundin C, Hodgson B, Sharma RA. DNA repair pathways as targets for cancer therapy. *Nat Rev Cancer*. 2008;8:193-204.
- (16) Flórez J. Quimioterapia antineoplásica I. Bases fundamentales. Antimetabolitos, fijadores a al tubulina, inhibidores de topoisomerasas. In: Flórez J, ed. *Farmacología Humana*. Barcelona: Elsevier España, S.L.; 2008:1019-1038.
- (17) Velasco Martin A, Cornide Santos M. Fármacos antineoplásicos. In: Velasco-Martin A, Román del Barrio L, Serrano Molina.J.S., eds. *Farmacología Fundamental*. Madrid: McGraw-Hill Interamericana; 2003:917-933.
- (18) van't Veer LJ, Bernards R. Enabling personalized cancer medicine through analysis of gene-expression patterns. *Nature*. 2008;452:564-570.
- (19) Duffy MJ, Crown J. A personalized approach to cancer treatment: how biomarkers can help. *Clin Chem*. 2008;54:1770-1779.
- (20) Folkman J, Hahnfeltd P, Hlatky L. Cancer: looking outside the genome. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2000;1:76-79.
- (21) Warburg O. On the origin of cancer cells. *Science*. 1956;123:309-314.
- (22) Delgado Cirilo A, Minguillón Llombart C, Joglar Tamargo J. Estrategias en la búsqueda de nuevos fármacos. In: Delgado Cirilo A, Minguillón Llombart C, Joglar Tamargo J, eds. *Introducción a la química terapéutica*. 2003:97-118.
- (23) Hoeijmakers JH. Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature*. 2001;411:366-374.
- (24) Lord CJ, Ashworth A. The DNA damage response and cancer therapy. *Nature*. 2012;481:287-294.
- (25) Lopez-Lazaro M. A new view of carcinogenesis and an alternative approach to cancer therapy. *Mol Med*. 2010;16:144-153.
- (26) Vander Heiden MG. Targeting cancer metabolism: a therapeutic window opens. *Nat Rev Drug Discov*. 2011;10:671-684.
- (27) Weinberg F, Chandel NS. Mitochondrial metabolism and cancer. *Ann N Y Acad Sci*. 2009;1177:66-73. doi: 10.1111/j.1749-6632.2009.05039.x.:66-73.
- (28) Frezza C, Gottlieb E. Mitochondria in cancer: not just innocent bystanders. *Semin Cancer Biol*. 2009;19:4-11.
- (29) Cairns RA, Harris IS, Mak TW. Regulation of cancer cell metabolism. *Nat Rev Cancer*. 2011;11:85-95.
- (30) Frezza C, Pollard PJ, Gottlieb E. Inborn and acquired metabolic defects in cancer. *J Mol Med (Berl)*. 2011;89:213-220.

## 10. BIBLIOGRAFÍA

- (31) Lopez-Lazaro M. The Warburg effect: why and how do cancer cells activate glycolysis in the presence of oxygen? *Anticancer Agents Med Chem.* 2008;8:305-312.
- (32) Bellance N, Benard G, Furt F et al. Bioenergetics of lung tumors: alteration of mitochondrial biogenesis and respiratory capacity. *Int J Biochem Cell Biol.* 2009;41:2566-2577.
- (33) Lopez-Lazaro M. Dual role of hydrogen peroxide in cancer: Possible relevance to cancer chemoprevention and therapy. *Cancer Lett.* 2007;252:1-8.
- (34) Klaunig JE, Kamendulis LM. The role of oxidative stress in carcinogenesis. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2004;44:239-267.
- (35) Manda G, Nechifor MT, Neagu TM. **Reactive Oxygen Species, Cancer and Anti-Cancer Therapies.** *Current Chemical Biology.* 2009;3:342-366.
- (36) Trachootham D, Alexandre J, Huang P. Targeting cancer cells by ROS-mediated mechanisms: a radical therapeutic approach? *Nat Rev Drug Discov.* 2009;8:579-591.
- (37) Schumacker PT. Reactive oxygen species in cancer cells: live by the sword, die by the sword. *Cancer Cell.* 2006;10:175-176.
- (38) Newman DJ, Cragg GM. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. *J Nat Prod.* 2007;70:461-477.
- (39) Pasteur L. Experiments and novel views on the nature of fermentation. *Comp Rend Acad Sci.* 1861;89:1260-1264.
- (40) Feron O. Pyruvate into lactate and back: from the Warburg effect to symbiotic energy fuel exchange in cancer cells. *Radiother Oncol.* 2009;92:329-333.
- (41) Webb BA, Chimenti M, Jacobson MP, Barber DL. Dysregulated pH: a perfect storm for cancer progression. *Nat Rev Cancer.* 2011;11:671-677.
- (42) Calderon-Montano JM, Burgos-Moron E, Perez-Guerrero C et al. **Role of the Intracellular pH in the Metabolic Switch between Oxidative Phosphorylation and Aerobic Glycolysis - Relevance to Cancer.** *WebMedCentral.* 2011.
- (43) Sottnik JL, Lori JC, Rose BJ, Thamm DH. Glycolysis inhibition by 2-deoxy-D-glucose reverts the metastatic phenotype in vitro and in vivo. *Clin Exp Metastasis.* 2011;28:865-875.
- (44) Xiao H, Li S, Zhang D et al. Separate and concurrent use of 2-deoxy-D-glucose and 3-bromopyruvate in pancreatic cancer cells. *Oncol Rep.* 2013;29:329-334.
- (45) Madhok BM, Yeluri S, Perry SL, Hughes TA, Jayne DG. Dichloroacetate induces apoptosis and cell-cycle arrest in colorectal cancer cells. *Br J Cancer.* 2010;102:1746-1752.

## 10. BIBLIOGRAFÍA

- (46) Madrona A, Pereira-Caro G, Mateos R et al. Synthesis of hydroxytyrosyl alkyl ethers from olive oil waste waters. *Molecules*. 2009;14:1762-1772.
- (47) Calderon-Montano JM, Madrona A, Burgos-Moron E et al. Selective cytotoxic activity of new lipophilic hydroxytyrosol alkyl ether derivatives. *J Agric Food Chem*. 2013.
- (48) Vega-Perez JM, Perinan I, Argandona M et al. Isoprenyl-thiourea and urea derivatives as new farnesyl diphosphate analogues: synthesis and in vitro antimicrobial and cytotoxic activities. *Eur J Med Chem*. 2012;58:591-612. doi: 10.1016/j.ejmech.2012.10.042. Epub;2012 Nov 1.:591-612.
- (49) Vega-Pérez J, Periñán I, Palo-Nieto C, Vega-Holm M, Iglesias-Guerra F. Alkenyl b-D-galactopyranoside derivatives as efficient chiral templates in stereoselective cyclopropanation and epoxidation reactions. *Tetrahedron: Asymmetry*. 2010;21:81-95.
- (50) Vega-Perez JM, Palo-Nieto C, Periñán I et al. **Stereoselective Dihydroxylation Reaction of Alkenyl  $\beta$ -D-Hexopyranosides: A Methodology for the Synthesis of Glycosylglycerol Derivatives and 1-OAcyl-3-O- $\beta$ -D-glycosyl-sn-glycerol Analogues**. *European Journal of Organic Chemistry*. 2012;1237-1252.
- (51) Khiar MM, Werner S, Mallouk S et al. Enantiopure Sulforaphane Analogues with Various Substituents at the Sulfinyl Sulfur: Asymmetric Synthesis and Biological Activities. *J Org Chem*. 2009;6002-6009.
- (52) Burton JD. The MTT assay to evaluate chemosensitivity. *Methods Mol Med*. 2005;110:69-78.:69-78.
- (53) Lopez-Lazaro M, Calderon-Montano JM, Burgos-Moron E, Austin CA. Green tea constituents (-)-epigallocatechin-3-gallate (EGCG) and gallic acid induce topoisomerase I- and topoisomerase II-DNA complexes in cells mediated by pyrogallol-induced hydrogen peroxide. *Mutagenesis*. 2011;26:489-498.
- (54) Monks A, Scudiero D, Skehan P et al. Feasibility of a high-flux anticancer drug screen using a diverse panel of cultured human tumor cell lines. *J Natl Cancer Inst*. 1991;83:757-766.
- (55) Kuo ML, Huang TS, Lin JK. Curcumin, an antioxidant and anti-tumor promoter, induces apoptosis in human leukemia cells. *Biochim Biophys Acta*. 1996;1317:95-100.
- (56) Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res*. 1988;175:184-191.
- (57) Willmore E, Frank AJ, Padget K, Tilby MJ, Austin CA. Etoposide targets topoisomerase IIalpha and IIbeta in leukemic cells: isoform-specific cleavable complexes visualized and quantified in situ by a novel immunofluorescence technique. *Mol Pharmacol*. 1998;54:78-85.

## 10. BIBLIOGRAFÍA

- (58) Cao X, Bloomston M, Zhang T et al. Synergistic antipancreatic tumor effect by simultaneously targeting hypoxic cancer cells with HSP90 inhibitor and glycolysis inhibitor. *Clin Cancer Res.* 2008;14:1831-1839.
- (59) Chou TC. Drug combination studies and their synergy quantification using the Chou-Talalay method. *Cancer Res.* 2010;70:440-446.
- (60) Hartley JA, O'Hare CC, Baumgart J. DNA alkylation and interstrand cross-linking by treosulfan. *Br J Cancer.* 1999;79:264-266.
- (61) Regan JD, Francis AA, Dunn WC et al. Repair of DNA damaged by mutagenic metabolites of benzo(a)pyrene in human cells. *Chem Biol Interact.* 1978;20:279-287.
- (62) Pashin YV, Bakhitova LM. Mutagenic and carcinogenic properties of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Environ Health Perspect.* 1979;30:185-9.:185-189.
- (63) Gao D, Luo Y, Guevara D et al. Benzo[a]pyrene and its metabolites combined with ultraviolet A synergistically induce 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine via reactive oxygen species. *Free Radic Biol Med.* 2005;39:1177-1183.
- (64) Szeliga J, Amin S. Quantitative reactions of anti 5,9-dimethylchrysene dihydrodiol epoxide with DNA and deoxyribonucleotides. *Chem Biol Interact.* 2000;128:159-172.
- (65) Meschini R, Berni A, Marotta E et al. DNA repair mechanisms involved in the removal of DBPDE-induced lesions leading to chromosomal alterations in CHO cells. *Cytogenet Genome Res.* 2010;128:124-130.
- (66) Spencer WA, Singh J, Orren DK. Formation and differential repair of covalent DNA adducts generated by treatment of human cells with (+/-)-anti-dibenzo[a,l]pyrene-11,12-diol-13,14-epoxide. *Chem Res Toxicol.* 2009;22:81-89.
- (67) Lee KM, Kim JC, Kang P et al. Chiral Aziridine-2-carboxylates: Versatile Precursors for Functionalized Tetrahydroisoquinoline (THIQ) Containing Heterocycles. *Tetrahedron.* 2012;68:883-893.
- (68) Dolence EK, Roylance JB. Optically active diethyl N-( p-toluenesulfonyl)-aziridine 2-phosphonates as chiral synthons for the synthesis of  $\beta$ -substituted amino phosphonates. *Tetrahedron: Asymmetry.* 2004;15.
- (69) Maanen MJ, Smeets CJ, Beijnen JH. Chemistry, pharmacology and pharmacokinetics of N,N',N''-triethylenethiophosphoramidate (ThioTEPA). *Cancer Treat Rev.* 2000;26:257-268.
- (70) Ishizeki S, Ohtsuka M, Irinoda K et al. Azinomycins A and B, new antitumor antibiotics. III. Antitumor activity. *J Antibiot (Tokyo).* 1987;40:60-65.
- (71) Jeong JU, Tao B., Sagasser I, Henniges H, Sharpless KB. Bromine-Catalyzed Aziridination of Olefins. A Rare Example of Atom-Transfer Redox Catalysis by



## 10. BIBLIOGRAFÍA

- a Main Group Element. *Journal of the American Chemical Society*. 1998;120:6844-6845.
- (72) Martin-Cordero C, Leon-Gonzalez AJ, Calderon-Montano JM, Burgos-Moron E, Lopez-Lazaro M. Pro-oxidant natural products as anticancer agents. *Curr Drug Targets*. 2012;13:1006-1028.
- (73) Alexandre J, Hu Y, Lu W, Pelicano H, Huang P. Novel action of paclitaxel against cancer cells: bystander effect mediated by reactive oxygen species. *Cancer Res*. 2007;67:3512-3517.
- (74) Dekhuijzen PN. Antioxidant properties of N-acetylcysteine: their relevance in relation to chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J*. 2004;23:629-636.
- (75) Zafarullah M, Li WQ, Sylvester J, Ahmad M. Molecular mechanisms of N-acetylcysteine actions. *Cell Mol Life Sci*. 2003;60:6-20.
- (76) Gatenby RA, Gillies RJ. Glycolysis in cancer: A potential target for therapy. *Int J Biochem Cell Biol*. 2007;39:1358-1366.
- (77) Atmaca A, Al Batran SE, Werner D et al. A randomised multicentre phase II study with cisplatin/docetaxel vs oxaliplatin/docetaxel as first-line therapy in patients with advanced or metastatic non-small cell lung cancer. *Br J Cancer*. 2013;108:265-270.
- (78) Shi SB, Hu RH, Qi JL et al. Treatment of stage IIIb/IV non-small cell lung cancer with Pemetrexed plus Oxaliplatin after failure of Erlotinib as second-line treatment. *Med Oncol*. 2013;30:550-0550.
- (79) Mir O, Boudou-Rouquette P, Giroux J et al. Pemetrexed, oxaliplatin and bevacizumab as first-line treatment in patients with stage IV non-small cell lung cancer. *Lung Cancer*. 2012;77:104-109.
- (80) Lee DH, Choi CM, Kim SW, Suh C, Lee JS. Phase II study of pemetrexed plus oxaliplatin for platinum-resistant advanced or metastatic non-small cell lung cancer patients. *Med Oncol*. 2012;29:640-643.
- (81) Mitchell PL, Broad A, Rosenthal MA et al. Randomized phase 2 sequencing and pharmacokinetic study of gemcitabine and oxaliplatin in advanced non-small cell lung cancer. *Asia Pac J Clin Oncol*. 2011;7:376-384.
- (82) Shiroyama T, Kijima T, Komuta K et al. Phase II tailored S-1 regimen study of first-line chemotherapy in elderly patients with advanced and recurrent non-small cell lung cancer. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2012;70:783-789.
- (83) Gruber G, Greiner RH, Hlushchuk R et al. Hypoxia-inducible factor 1 alpha in high-risk breast cancer: an independent prognostic parameter? *Breast Cancer Res*. 2004;6:R191-R198.
- (84) Curtin NJ. DNA repair dysregulation from cancer driver to therapeutic target. *Nat Rev Cancer*. 2012;12:801-817.

## 10. BIBLIOGRAFÍA

- (85) Andressoo JO, Hoeijmakers JH, de Waard H. Nucleotide excision repair and its connection with cancer and ageing. *Adv Exp Med Biol.* 2005;570:45-83. doi: 10.1007/1-4020-3764-3\_3.:45-83.
- (86) Wei Q, Cheng L, Hong WK, Spitz MR. Reduced DNA repair capacity in lung cancer patients. *Cancer Res.* 1996;56:4103-4107.
- (87) Park YS, Koh YH, Takahashi M et al. Identification of the binding site of methylglyoxal on glutathione peroxidase: methylglyoxal inhibits glutathione peroxidase activity via binding to glutathione binding sites Arg 184 and 185. *Free Radic Res.* 2003;37:205-211.
- (88) Nitiss JL. Targeting DNA topoisomerase II in cancer chemotherapy. *Nat Rev Cancer.* 2009;9:338-350.
- (89) Pommier Y. Topoisomerase I inhibitors: camptothecins and beyond. *Nat Rev Cancer.* 2006;6:789-802.
- (90) Binaschi M, Zagotto G, Palumbo M et al. Irreversible and reversible topoisomerase II DNA cleavage stimulated by clerocidin: sequence specificity and structural drug determinants. *Cancer Res.* 1997;57:1710-1716.
- (91) Lopez-Lazaro M, Willmore E, Elliott SL, Austin CA. Selenite induces topoisomerase I and II-DNA complexes in K562 leukemia cells. *Int J Cancer.* 2008;123:2217-2221.
- (92) Sordet O, Goldman A, Pommier Y. Topoisomerase II and tubulin inhibitors both induce the formation of apoptotic topoisomerase I cleavage complexes. *Mol Cancer Ther.* 2006;5:3139-3144.
- (93) Yang CS, Wang X, Lu G, Picinich SC. Cancer prevention by tea: animal studies, molecular mechanisms and human relevance. *Nat Rev Cancer.* 2009;9:429-439.
- (94) Khan N, Afaq F, Saleem M, Ahmad N, Mukhtar H. Targeting multiple signaling pathways by green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate. *Cancer Res.* 2006;66:2500-2505.
- (95) Khan N, Mukhtar H. Multitargeted therapy of cancer by green tea polyphenols. *Cancer Lett.* 2008;269:269-280.
- (96) Clement Y. Can green tea do that? A literature review of the clinical evidence. *Prev Med.* 2009;49:83-87.
- (97) Akagawa M, Shigemitsu T, Suyama K. Production of hydrogen peroxide by polyphenols and polyphenol-rich beverages under quasi-physiological conditions. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2003;67:2632-2640.
- (98) Liu KC, Ho HC, Huang AC et al. Gallic acid provokes DNA damage and suppresses DNA repair gene expression in human prostate cancer PC-3 cells. *Environ Toxicol.* 2011;10.

## 10. BIBLIOGRAFÍA

- (99) Moran JF, Klucas RV, Grayer RJ, Abian J, Becana M. Complexes of iron with phenolic compounds from soybean nodules and other legume tissues: prooxidant and antioxidant properties. *Free Radic Biol Med.* 1997;22:861-870.
- (100) Mazzei JL, de Souza LJ, Felzenszwalb I. The influence of pH on the inhibition of DNA cleavages induced by pyrogallol. *Redox Rep.* 2008;13:208-212.
- (101) Prise KM, Davies S, Michael BD. Cell killing and DNA damage in Chinese hamster V79 cells treated with hydrogen peroxide. *Int J Radiat Biol.* 1989;55:583-592.
- (102) Dahm-Daphi J, Sass C, Alberti W. Comparison of biological effects of DNA damage induced by ionizing radiation and hydrogen peroxide in CHO cells. *Int J Radiat Biol.* 2000;76:67-75.
- (103) Harper JV, Anderson JA, O'Neill P. Radiation induced DNA DSBs: Contribution from stalled replication forks? *DNA Repair (Amst).* 2010;9:907-913.
- (104) Orta ML, Calderon-Montano JM, Dominguez I et al. 5-Aza-2'-deoxycytidine causes replication lesions that require Fanconi anemia-dependent homologous recombination for repair. *Nucleic Acids Res.* 2013.
- (105) Higdon JV, Frei B. Coffee and health: a review of recent human research. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2006;46:101-123.
- (106) Arab L. Epidemiologic evidence on coffee and cancer. *Nutr Cancer.* 2010;62:271-283.
- (107) Long LH, Halliwell B. Coffee drinking increases levels of urinary hydrogen peroxide detected in healthy human volunteers. *Free Radic Res.* 2000;32:463-467.
- (108) Hiramoto K, Kida T, Kikugawa K. Increased urinary hydrogen peroxide levels caused by coffee drinking. *Biol Pharm Bull.* 2002;25:1467-1471.
- (109) Hegele J, Munch G, Pischetsrieder M. Identification of hydrogen peroxide as a major cytotoxic component in Maillard reaction mixtures and coffee. *Mol Nutr Food Res.* 2009;53:760-769.
- (110) Kono Y, Kobayashi K, Tagawa S et al. Antioxidant activity of polyphenolics in diets. Rate constants of reactions of chlorogenic acid and caffeic acid with reactive species of oxygen and nitrogen. *Biochim Biophys Acta.* 1997;1335:335-342.
- (111) Zheng LF, Dai F, Zhou B, Yang L, Liu ZL. Prooxidant activity of hydroxycinnamic acids on DNA damage in the presence of Cu(II) ions: mechanism and structure-activity relationship. *Food Chem Toxicol.* 2008;46:149-156.

## 10. BIBLIOGRAFÍA

- (112) Daroui P, Desai SD, Li TK, Liu AA, Liu LF. Hydrogen peroxide induces topoisomerase I-mediated DNA damage and cell death. *J Biol Chem.* 2004;279:14587-14594.
- (113) Sofi F, Abbate R, Gensini GF, Casini A. Accruing evidence on benefits of adherence to the Mediterranean diet on health: an updated systematic review and meta-analysis. *Am J Clin Nutr.* 2010;92:1189-1196.
- (114) Kontou N, Psaltopoulou T, Panagiotakos D, Dimopoulos MA, Linos A. The mediterranean diet in cancer prevention: a review. *J Med Food.* 2011;14:1065-1078.
- (115) Urpi-Sarda M, Casas R, Chiva-Blanch G et al. Virgin olive oil and nuts as key foods of the Mediterranean diet effects on inflammatory biomarkers related to atherosclerosis. *Pharmacol Res.* 2012;65:577-583.
- (116) Visioli F, Bernardini E. Extra virgin olive oil's polyphenols: biological activities. *Curr Pharm Des.* 2011;17:786-804.
- (117) Psaltopoulou T, Kosti RI, Haidopoulos D, Dimopoulos M, Panagiotakos DB. Olive oil intake is inversely related to cancer prevalence: a systematic review and a meta-analysis of 13,800 patients and 23,340 controls in 19 observational studies. *Lipids Health Dis.* 2011;10:127. doi: 10.1186/1476-511X-10-127.:127-10.
- (118) Sanchez-Fidalgo S, Sanchez d, I, Cardeno A, Alarcon dLL. Influence of extra virgin olive oil diet enriched with hydroxytyrosol in a chronic DSS colitis model. *Eur J Nutr.* 2012;51:497-506.
- (119) Granados-Principal S, Quiles JL, Ramirez-Tortosa CL, Sanchez-Rovira P, Ramirez-Tortosa MC. Hydroxytyrosol: from laboratory investigations to future clinical trials. *Nutr Rev.* 2010;68:191-206.
- (120) Cornwell DG, Ma J. Nutritional benefit of olive oil: the biological effects of hydroxytyrosol and its arylating quinone adducts. *J Agric Food Chem.* 2008;56:8774-8786.
- (121) Hagiwara K, Goto T, Araki M, Miyazaki H, Hagiwara H. Olive polyphenol hydroxytyrosol prevents bone loss. *Eur J Pharmacol.* 2011;662:78-84.
- (122) Ragione FD, Cucciolla V, Borriello A et al. Hydroxytyrosol, a natural molecule occurring in olive oil, induces cytochrome c-dependent apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000;278:733-739.
- (123) Granados-Principal S, Quiles JL, Ramirez-Tortosa C et al. Hydroxytyrosol inhibits growth and cell proliferation and promotes high expression of sfrp4 in rat mammary tumours. *Mol Nutr Food Res.* 2011;55 Suppl 1:S117-26. doi: 10.1002/mnfr.201000220. Epub;2010 Dec 1.:S117-S126.
- (124) Fabiani R, Sepporta MV, Rosignoli P et al. Anti-proliferative and pro-apoptotic activities of hydroxytyrosol on different tumour cells: the role of extracellular production of hydrogen peroxide. *Eur J Nutr.* 2012;51:455-464.

## 10. BIBLIOGRAFÍA

- (125) Zrelli H, Matsuka M, Araki M, Zarrouk M, Miyazaki H. Hydroxytyrosol induces vascular smooth muscle cells apoptosis through NO production and PP2A activation with subsequent inactivation of Akt. *Planta Med.* 2011;77:1680-1686.
- (126) Han J, Talorete TP, Yamada P, Isoda H. Anti-proliferative and apoptotic effects of oleuropein and hydroxytyrosol on human breast cancer MCF-7 cells. *Cytotechnology.* 2009;59:45-53.
- (127) Fabiani R, Fuccelli R, Pieravanti F, De Bartolomeo A, Morozzi G. Production of hydrogen peroxide is responsible for the induction of apoptosis by hydroxytyrosol on HL60 cells. *Mol Nutr Food Res.* 2009;53:887-896.
- (128) Warleta F, Quesada CS, Campos M et al. Hydroxytyrosol protects against oxidative DNA damage in human breast cells. *Nutrients.* 2011;3:839-857.
- (129) Bernini R, Merendino N, Romani A, Velotti F. Naturally occurring hydroxytyrosol: synthesis and anticancer potential. *Curr Med Chem.* 2013;20:655-670.
- (130) Svilar D, Goellner EM, Almeida KH, Sobol RW. Base excision repair and lesion-dependent subpathways for repair of oxidative DNA damage. *Antioxid Redox Signal.* 2011;14:2491-2507.
- (131) Jemal A, Bray F, Center MM et al. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin.* 2011;61:69-90.
- (132) Pereira-Caro G, Sarria B, Madrona A et al. Digestive stability of hydroxytyrosol, hydroxytyrosyl acetate and alkyl hydroxytyrosyl ethers. *Int J Food Sci Nutr.* 2012;63:703-707.
- (133) Munoz-Marin J, De La Cruz JP, Guerrero A et al. Cytoprotective effect of hydroxytyrosyl alkyl ether derivatives after oral administration to rats in a model of glucose-oxygen deprivation in brain slices. *J Agric Food Chem.* 2012;60:7659-7664.
- (134) Mijatovic T, Van Quaquebeke E, Delest B et al. Cardiotonic steroids on the road to anti-cancer therapy. *Biochim Biophys Acta.* 2007;1776:32-57.
- (135) Prassas I, Diamandis EP. Novel therapeutic applications of cardiac glycosides. *Nat Rev Drug Discov.* 2008;7:926-935.
- (136) Winnicka K, Bielawski K, Bielawska A. Cardiac glycosides in cancer research and cancer therapy. *Acta Pol Pharm.* 2006;63:109-115.
- (137) Rashan LJ, Franke K, Khine MM et al. Characterization of the anticancer properties of monoglycosidic cardenolides isolated from *Nerium oleander* and *Streptocaulon tomentosum*. *J Ethnopharmacol.* 2011;134:781-788.
- (138) Wong SK, Lim YY, Abdullah NR, Nordin FJ. Antiproliferative and phytochemical analyses of leaf extracts of ten Apocynaceae species. *Pharmacognosy Res.* 2011;3:100-106.

## 10. BIBLIOGRAFÍA

- (139) Smith JA, Madden T, Vijjeswarapu M, Newman RA. Inhibition of export of fibroblast growth factor-2 (FGF-2) from the prostate cancer cell lines PC3 and DU145 by Anvirzel and its cardiac glycoside component, oleandrin. *Biochem Pharmacol.* 2001;62:469-472.
- (140) Newman RA, Yang P, Hittelman WN et al. Oleandrin-mediated oxidative stress in human melanoma cells. *J Exp Ther Oncol.* 2006;5:167-181.
- (141) Sreenivasan Y, Raghavendra PB, Manna SK. Oleandrin-mediated expression of Fas potentiates apoptosis in tumor cells. *J Clin Immunol.* 2006;26:308-322.
- (142) Mekhail T, Kaur H, Ganapathi R et al. Phase 1 trial of Anvirzel in patients with refractory solid tumors. *Invest New Drugs.* 2006;24:423-427.
- (143) Jornada LK, Valvassori SS, Arent CO et al. DNA damage after intracerebroventricular injection of ouabain in rats. *Neurosci Lett.* 2010;471:6-9.
- (144) Lopez-Lazaro M, Pastor N, Azrak SS et al. Digitoxin, at concentrations commonly found in the plasma of cardiac patients, antagonizes etoposide and idarubicin activity in K562 leukemia cells. *Leuk Res.* 2006;30:895-898.
- (145) Gupta RS, Chopra A, Stetsko DK. Cellular basis for the species differences in sensitivity to cardiac glycosides (digitalis). *J Cell Physiol.* 1986;127:197-206.
- (146) Chen Z, Lu W, Garcia-Prieto C, Huang P. The Warburg effect and its cancer therapeutic implications. *J Bioenerg Biomembr.* 2007;39:267-274.
- (147) Paul RJ, Bauer M, Pease W. Vascular smooth muscle: aerobic glycolysis linked to sodium and potassium transport processes. *Science.* 1979;206:1414-1416.
- (148) James JH, Fang CH, Schrantz SJ et al. Linkage of aerobic glycolysis to sodium-potassium transport in rat skeletal muscle. Implications for increased muscle lactate production in sepsis. *J Clin Invest.* 1996;98:2388-2397.
- (149) Lopez-Lazaro M. Digitoxin as an anticancer agent with selectivity for cancer cells: possible mechanisms involved. *Expert Opin Ther Targets.* 2007;11:1043-1053.
- (150) Mijatovic T, Roland I, Van Quaquebeke E et al. The alpha1 subunit of the sodium pump could represent a novel target to combat non-small cell lung cancers. *J Pathol.* 2007;212:170-179.
- (151) Yang P, Cartwright C, Efuet E et al. Cellular location and expression of Na(+), K(+)-ATPase alpha subunits affect the anti-proliferative activity of oleandrin. *Mol Carcinog.* 2012;10.
- (152) Kishimoto S, Kawazoe Y, Ikeno M et al. Role of Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase alpha1 subunit in the intracellular accumulation of cisplatin. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2006;57:84-90.
- (153) Hauptman PJ, Garg R, Kelly RA. Cardiac glycosides in the next millennium. *Prog Cardiovasc Dis.* 1999;41:247-254.

## 10. BIBLIOGRAFÍA

- (154) Rahimtoola SH, Tak T. The use of digitalis in heart failure. *Curr Probl Cardiol.* 1996;21:781-853.
- (155) Stenkvist B. Is digitalis a therapy for breast carcinoma? *Oncol Rep.* 1999;6:493-496.
- (156) Lopez-Lazaro M, Pastor N, Azrak SS et al. Digitoxin inhibits the growth of cancer cell lines at concentrations commonly found in cardiac patients. *J Nat Prod.* 2005;68:1642-1645.
- (157) Johansson S, Lindholm P, Gullbo J et al. Cytotoxicity of digitoxin and related cardiac glycosides in human tumor cells. *Anticancer Drugs.* 2001;12:475-483.
- (158) Ramirez-Ortega M, Maldonado-Lagunas V, Melendez-Zajgla J et al. Proliferation and apoptosis of HeLa cells induced by in vitro stimulation with digitalis. *Eur J Pharmacol.* 2006;534:71-76.
- (159) Zhang H, Qian DZ, Tan YS et al. Digoxin and other cardiac glycosides inhibit HIF-1 $\alpha$  synthesis and block tumor growth. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105:19579-19586.
- (160) Bielawski K, Winnicka K, Bielawska A. Inhibition of DNA topoisomerases I and II, and growth inhibition of breast cancer MCF-7 cells by ouabain, digoxin and proscillaridin A. *Biol Pharm Bull.* 2006;29:1493-1497.
- (161) Perne A, Muellner MK, Steinrueck M et al. Cardiac glycosides induce cell death in human cells by inhibiting general protein synthesis. *PLoS One.* 2009;4:e8292.
- (162) Hallbook H, Felth J, Eriksson A et al. Ex vivo activity of cardiac glycosides in acute leukaemia. *PLoS One.* 2011;6:e15718.
- (163) Joshi AD, Parsons DW, Velculescu VE, Riggins GJ. Sodium ion channel mutations in glioblastoma patients correlate with shorter survival. *Mol Cancer.* 2011;10:17. doi: 10.1186/1476-4598-10-17.:17-10.
- (164) Newman RA, Yang P, Pawlus AD, Block KI. Cardiac glycosides as novel cancer therapeutic agents. *Mol Interv.* 2008;8:36-49.
- (165) Huang YT, Chueh SC, Teng CM, Guh JH. Investigation of ouabain-induced anticancer effect in human androgen-independent prostate cancer PC-3 cells. *Biochem Pharmacol.* 2004;67:727-733.
- (166) Lynch RM, Balaban RS. Coupling of aerobic glycolysis and Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase in renal cell line MDCK. *Am J Physiol.* 1987;253:C269-C276.
- (167) Pellerin L, Magistretti PJ. Glutamate uptake into astrocytes stimulates aerobic glycolysis: a mechanism coupling neuronal activity to glucose utilization. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994;91:10625-10629.
- (168) Scholnick P, Lang D, Racker E. Regulatory mechanisms in carbohydrate metabolism. IX. Stimulation of aerobic glycolysis by energy-linked ion transport and inhibition by dextran sulfate. *J Biol Chem.* 1973;248:5175.



## 10. BIBLIOGRAFÍA

- (169) Hiyoshi H, Abdelhady S, Segerstrom L et al. Quiescence and gammaH2AX in neuroblastoma are regulated by ouabain/Na,K-ATPase. *Br J Cancer*. 2012;106:1807-1815.
- (170) Tailler M, Senovilla L, Lainey E et al. Antineoplastic activity of ouabain and pyrithione zinc in acute myeloid leukemia. *Oncogene*. 2012;31:3536-3546.
- (171) Badr CE, Wurdinger T, Nilsson J et al. Lanatoside C sensitizes glioblastoma cells to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand and induces an alternative cell death pathway. *Neuro Oncol*. 2011;13:1213-1224.
- (172) Xie XB, Yin JQ, Wen LL et al. Critical role of heat shock protein 27 in bufalin-induced apoptosis in human osteosarcomas: a proteomic-based research. *PLoS One*. 2012;7:e47375.
- (173) Zhang DM, Liu JS, Deng LJ et al. Arenobufagin, a natural bufadienolide from toad venom, induces apoptosis and autophagy in human hepatocellular carcinoma cells through inhibition of PI3K/Akt/mTOR pathway. *Carcinogenesis*. 2013.
- (174) Zhang DM, Liu JS, Tang MK et al. Bufotalin from *Venenum Bufonis* inhibits growth of multidrug resistant HepG2 cells through G2/M cell cycle arrest and apoptosis. *Eur J Pharmacol*. 2012;692:19-28.
- (175) Weidemann H. Na/K-ATPase, endogenous digitalis like compounds and cancer development -- a hypothesis. *Front Biosci*. 2005;10:2165-76.:2165-2176.
- (176) Mijatovic T, Dufrasne F, Kiss R. Cardiotonic steroids-mediated targeting of the Na(+)/K(+)-ATPase to combat chemoresistant cancers. *Curr Med Chem*. 2012;19:627-646.
- (177) Felth J, Rickardson L, Rosen J et al. Cytotoxic effects of cardiac glycosides in colon cancer cells, alone and in combination with standard chemotherapeutic drugs. *J Nat Prod*. 2009;72:1969-1974.
- (178) Liaw CC, Wu TY, Chang FR, Wu YC. Historic perspectives on Annonaceous acetogenins from the chemical bench to preclinical trials. *Planta Med*. 2010;76:1390-1404.
- (179) Colin SJ. The naturally occurring furanones: formation and function from pheromone to food. *Biol Rev Camb Philos Soc*. 1999;74:259-276.
- (180) Yuan J, Liu H, Zhou LH, Zou YL, Lu WQ. Oxidative stress and DNA damage induced by a drinking-water chlorination disinfection byproduct 3-chloro-4-(dichloromethyl)-5-hydroxy-2(5H)-furanone (MX) in mice. *Mutat Res*. 2006;609:129-136.
- (181) Roginskaya M, Razskazovskiy Y, Bernhard WA. 2-Deoxyribonolactone lesions in X-ray-irradiated DNA: quantitative determination by catalytic 5-methylene-2-furanone release. *Angew Chem Int Ed Engl*. 2005;44:6210-6213.

## 10. BIBLIOGRAFÍA

- (182) McGlacken GP, Fairlamb IJ. 2-Pyrone natural products and mimetics: isolation, characterisation and biological activity. *Nat Prod Rep.* 2005;22:369-385.
- (183) Lacy A, O'Kennedy R. Studies on coumarins and coumarin-related compounds to determine their therapeutic role in the treatment of cancer. *Curr Pharm Des.* 2004;10:3797-3811.
- (184) Lee SH, Oe T, Blair IA. Vitamin C-induced decomposition of lipid hydroperoxides to endogenous genotoxins. *Science.* 2001;292:2083-2086.
- (185) Lopez-Lazaro M, Martin-Cordero C, Bermejo A, Cortes D, Ayuso MJ. Cytotoxic compounds from *Annonaceus* species as DNA topoisomerase I poisons. *Anticancer Res.* 2001;21:3493-3497.
- (186) Bielawski K, Winnicka K, Bielawska A. Inhibition of DNA topoisomerases I and II, and growth inhibition of breast cancer MCF-7 cells by ouabain, digoxin and proscillaridin A. *Biol Pharm Bull.* 2006;29:1493-1497.
- (187) Vander Heiden MG, Cantley LC, Thompson CB. Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science.* 2009;324:1029-1033.
- (188) Wondrak GT. Redox-directed cancer therapeutics: molecular mechanisms and opportunities. *Antioxid Redox Signal.* 2009.
- (189) Zhang Q, Pan J, North PE et al. Aerosolized 3-bromopyruvate inhibits lung tumorigenesis without causing liver toxicity. *Cancer Prev Res (Phila).* 2012;5:717-725.
- (190) Lea MA, Qureshi MS, Buxhoeveden M et al. Regulation of the proliferation of colon cancer cells by compounds that affect glycolysis, including 3-bromopyruvate, 2-deoxyglucose and biguanides. *Anticancer Res.* 2013;33:401-407.
- (191) Maschek G, Savaraj N, Priebe W et al. 2-deoxy-D-glucose increases the efficacy of adriamycin and paclitaxel in human osteosarcoma and non-small cell lung cancers in vivo. *Cancer Res.* 2004;64:31-34.
- (192) Giammarioli AM, Gambardella L, Barbati C et al. Differential effects of the glycolysis inhibitor 2-deoxy-D-glucose on the activity of pro-apoptotic agents in metastatic melanoma cells, and induction of a cytoprotective autophagic response. *Int J Cancer.* 2012;131:E337-E347.
- (193) Sun RC, Fadia M, Dahlstrom JE et al. Reversal of the glycolytic phenotype by dichloroacetate inhibits metastatic breast cancer cell growth in vitro and in vivo. *Breast Cancer Res Treat.* 2010;120:253-260.
- (194) Olszewski U, Poulsen TT, Ulsperger E et al. In vitro cytotoxicity of combinations of dichloroacetate with anticancer platinum compounds. *Clin Pharmacol.* 2010;2:177-83. doi: 10.2147/CPAA.S11795. Epub;2010 Sep 14.:177-183.

## 10. BIBLIOGRAFÍA

- (195) Washington JT, Quintyne NJ. Dichloroacetate induces different rates of cell death in cancer and noncancer cell lines in vitro. *Tumori*. 2012;98:142-151.
- (196) Pereira da Silva AP, El Bacha T, Kyaw N et al. Inhibition of energy-producing pathways of HepG2 cells by 3-bromopyruvate. *Biochem J*. 2009;417:717-726.
- (197) Rosso M, Munoz M, Berger M. The role of neurokinin-1 receptor in the microenvironment of inflammation and cancer. *ScientificWorldJournal*. 2012;2012:381434. doi: 10.1100/2012/381434. Epub;2012 Apr 1.:381434.
- (198) Munoz M, Martinez-Armesto J, Covenas R. NK-1 receptor antagonists as antitumor drugs: a survey of the literature from 2000 to 2011. *Expert Opin Ther Pat*. 2012;22:735-746.
- (199) Bhandari PR. Recent advances in pharmacotherapy of chemotherapy-induced nausea and vomiting. *J Adv Pharm Technol Res*. 2012;3:202-209.
- (200) Munoz M, Gonzalez-Ortega A, Rosso M et al. The substance P/neurokinin-1 receptor system in lung cancer: focus on the antitumor action of neurokinin-1 receptor antagonists. *Peptides*. 2012;38:318-325.
- (201) Munoz M, Perez A, Rosso M, Zamarriego C, Rosso R. Antitumoral action of the neurokinin-1 receptor antagonist L-733 060 on human melanoma cell lines. *Melanoma Res*. 2004;14:183-188.
- (202) Arnaudeau C, Tenorio ME, Jenssen D, Helleday T. Inhibition of DNA synthesis is a potent mechanism by which cytostatic drugs induce homologous recombination in mammalian cells. *Mutat Res*. 2000;461:221-228.
- (203) Alexandre J, Batteux F, Nicco C et al. Accumulation of hydrogen peroxide is an early and crucial step for paclitaxel-induced cancer cell death both in vitro and in vivo. *Int J Cancer*. 2006;119:41-48.
- (204) Lopez-Lazaro M. Anticancer and carcinogenic properties of curcumin: considerations for its clinical development as a cancer chemopreventive and chemotherapeutic agent. *Mol Nutr Food Res*. 2008;52 Suppl 1:S103-27.:S103-S127.
- (205) Shishodia S, Chaturvedi MM, Aggarwal BB. Role of curcumin in cancer therapy. *Curr Probl Cancer*. 2007;31:243-305.
- (206) Karunakaran D, Rashmi R, Kumar TR. Induction of apoptosis by curcumin and its implications for cancer therapy. *Curr Cancer Drug Targets*. 2005;5:117-129.
- (207) Su CC, Lin JG, Li TM et al. Curcumin-induced apoptosis of human colon cancer colo 205 cells through the production of ROS, Ca<sup>2+</sup> and the activation of caspase-3. *Anticancer Res*. 2006;26:4379-4389.
- (208) Atsumi T, Tonosaki K, Fujisawa S. Comparative cytotoxicity and ROS generation by curcumin and tetrahydrocurcumin following visible-light irradiation or treatment with horseradish peroxidase. *Anticancer Res*. 2007;27:363-371.

## 10. BIBLIOGRAFÍA

- (209) McNally SJ, Harrison EM, Ross JA, Garden OJ, Wigmore SJ. Curcumin induces heme oxygenase 1 through generation of reactive oxygen species, p38 activation and phosphatase inhibition. *Int J Mol Med*. 2007;19:165-172.
- (210) Burgos-Moron E, Calderon-Montano JM, Salvador J, Robles A, Lopez-Lazaro M. The dark side of curcumin. *Int J Cancer*. 2009.
- (211) Lopez-Lazaro M, Willmore E, Austin CA. The dietary flavonoids myricetin and fisetin act as dual inhibitors of DNA topoisomerases I and II in cells. *Mutat Res*. 2010;696:41-47.
- (212) Chen Q, Espey MG, Krishna MC et al. Pharmacologic ascorbic acid concentrations selectively kill cancer cells: action as a pro-drug to deliver hydrogen peroxide to tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102:13604-13609.
- (213) Padayatty SJ, Riordan HD, Hewitt SM et al. Intravenously administered vitamin C as cancer therapy: three cases. *CMAJ*. 2006;174:937-942.
- (214) Bejanyan N, Tiu RV, Raza A et al. A phase 2 trial of combination therapy with thalidomide, arsenic trioxide, dexamethasone, and ascorbic acid (TADA) in patients with overlap myelodysplastic/myeloproliferative neoplasms (MDS/MPN) or primary myelofibrosis (PMF). *Cancer*. 2012;118:3968-3976.
- (215) Monti DA, Mitchell E, Bazzan AJ et al. Phase I evaluation of intravenous ascorbic acid in combination with gemcitabine and erlotinib in patients with metastatic pancreatic cancer. *PLoS One*. 2012;7:e29794.
- (216) Bhat KPL, Kosmeder JW, Pezzuto JM. Biological effects of resveratrol. *Antioxid Redox Signal*. 2001;3:1041-1064.
- (217) Hussain AR, Uddin S, Bu R et al. Resveratrol suppresses constitutive activation of AKT via generation of ROS and induces apoptosis in diffuse large B cell lymphoma cell lines. *PLoS One*. 2011;6:e24703.
- (218) Juan ME, Wenzel U, Daniel H, Planas JM. Resveratrol induces apoptosis through ROS-dependent mitochondria pathway in HT-29 human colorectal carcinoma cells. *J Agric Food Chem*. 2008;56:4813-4818.
- (219) Miki H, Uehara N, Kimura A et al. Resveratrol induces apoptosis via ROS-triggered autophagy in human colon cancer cells. *Int J Oncol*. 2012;40:1020-1028.
- (220) Yeh CT, Yen GC. Effect of sulforaphane on metallothionein expression and induction of apoptosis in human hepatoma HepG2 cells. *Carcinogenesis*. 2005;26:2138-2148.
- (221) Singh SV, Srivastava SK, Choi S et al. Sulforaphane-induced cell death in human prostate cancer cells is initiated by reactive oxygen species. *J Biol Chem*. 2005;280:19911-19924.

## 10. BIBLIOGRAFÍA

- (222) Sarkar R, Mukherjee S, Biswas J, Roy M. Sulphoraphane, a naturally occurring isothiocyanate induces apoptosis in breast cancer cells by targeting heat shock proteins. *Biochem Biophys Res Commun.* 2012;427:80-85.
- (223) Loya S, Reshef V, Mizrahi E et al. The inhibition of the reverse transcriptase of HIV-1 by the natural sulfoglycolipids from cyanobacteria: contribution of different moieties to their high potency. *J Nat Prod.* 1998;61:891-895.
- (224) Morimoto T, Nagatsu A, Murakami N et al. Anti-tumour-promoting glyceroglycolipids from the green alga, *Chlorella vulgaris*. *Phytochemistry.* 1995;40:1433-1437.
- (225) Himmelstein KJ, Patton TF, Belt RJ et al. Clinical kinetics on intact cisplatin and some related species. *Clin Pharmacol Ther.* 1981;29:658-664.
- (226) van Hennik MB, van der Vijgh WJ, Klein I et al. Comparative pharmacokinetics of cisplatin and three analogues in mice and humans. *Cancer Res.* 1987;47:6297-6301.
- (227) Friboulet L, Barrios-Gonzales D, Commo F et al. Molecular Characteristics of ERCC1-Negative versus ERCC1-Positive Tumors in Resected NSCLC. *Clin Cancer Res.* 2011;17:5562-5572.
- (228) Lemarie F, Chang CW, Blatchford DR et al. Antitumor activity of the tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate encapsulated in targeted vesicles after intravenous administration. *Nanomedicine (Lond).* 2013;8:181-192.
- (229) Zerbe LK, Dwyer-Nield LD, Fritz JM et al. Inhibition by erlotinib of primary lung adenocarcinoma at an early stage in male mice. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2008;62:605-620.
- (230) Singh RP, Deep G, Chittezhath M et al. Effect of silibinin on the growth and progression of primary lung tumors in mice. *J Natl Cancer Inst.* 2006;98:846-855.
- (231) Malkinson AM. Primary lung tumors in mice as an aid for understanding, preventing, and treating human adenocarcinoma of the lung. *Lung Cancer.* 2001;32:265-279.
- (232) Malkinson AM. Primary lung tumors in mice: an experimentally manipulable model of human adenocarcinoma. *Cancer Res.* 1992;52:2670s-2676s.
- (233) Shi HS, Yang LP, Wei W et al. Systemically administered liposome-encapsulated Ad-PEDF potentiates the anti-cancer effects in mouse lung metastasis melanoma. *J Transl Med.* 2013;11:86.
- (234) Zhao J, Qi Q, Yang Y et al. Inhibition of alpha(4) integrin mediated adhesion was involved in the reduction of B16-F10 melanoma cells lung colonization in C57BL/6 mice treated with gambogic acid. *Eur J Pharmacol.* 2008;589:127-131.

## **10. BIBLIOGRAFÍA**







**ANEXO I. CONTROLES POSITIVOS Y NEGATIVOS.****I.I. CONTROLES PARA LOS ENSAYOS DE VIABILIDAD CELULAR.**

Todos los experimentos fueron realizados junto con una serie de compuestos controles. Por una lado se utilizaron fármacos anticancerosos utilizados en clínica (cisplatino, 5-fluorouracilo e hidroxiurea) para la comparación de la actividad anticancerosa de los compuestos evaluados en esta tesis con fármacos anticancerosos usados en clínica. Un ejemplo representativo del efecto de estos fármacos anticancerosos sobre las células cancerosas y células no malignas utilizadas en esta tesis está recogido en la Figura I y en la Tabla I.

Por otro lado, el objetivo principal de esta tesis fue la búsqueda de nuevos fármacos anticancerosos más selectivos para el tratamiento del cáncer. Para cumplir este objetivo, una de las herramientas utilizadas fue la evaluación del efecto citotóxico de los compuestos evaluados sobre células cancerosas de pulmón A549 y sobre células normales de pulmón MRC-5. En estos experimentos fueron utilizados el ácido cítrico y el hipoclorito sódico como controles negativos de selectividad, para verificar que no todos los compuestos mostraban citotoxicidad selectiva hacia las células cancerosas. En la Tabla I están recogidos los valores de IC<sub>50</sub> de estos compuestos obtenidos de tres experimentos independientes representativos.

Células		IC <sub>50</sub> (medias $\pm$ SEM; $\mu$ M)					
		5-FU	Cisplatino	Hidroxiurea	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Ácido cítrico	Hipoclorito sódico (%)
No malignas	MRC-5	>1000	138,5 $\pm$ 51,3	-	405,6 $\pm$ 18,3	6,0 $\pm$ 0,1	0,006 $\pm$ 0,001
	MCF10	<0,1	22,6 $\pm$ 3,7	-	-	-	-
	VH10	>1000	-	>1000	98,2 $\pm$ 32,7	-	-
Cancerosas	A549	51,6 $\pm$ 45,1	12,9 $\pm$ 4,7	-	58,6 $\pm$ 7,3	7,5 $\pm$ 0,2	0,013 $\pm$ 0,001
	MCF7	0,1 $\pm$ 0	25,0 $\pm$ 2,0	-	-	-	-
	UACC-62	195,7 $\pm$ 190,4	-	521,3 $\pm$ 190,3	37,9 $\pm$ 4,8	-	-
	HT29	285 $\pm$ 62,9	-	-	-	-	-

Tabla I. Valores IC<sub>50</sub> de diferentes compuestos utilizados como controles durante los ensayos MTT. Estos valores se obtuvieron a partir de los datos recogidos de viabilidad celular tras un tratamiento de 48 h con varios compuestos utilizados de control (MTT).

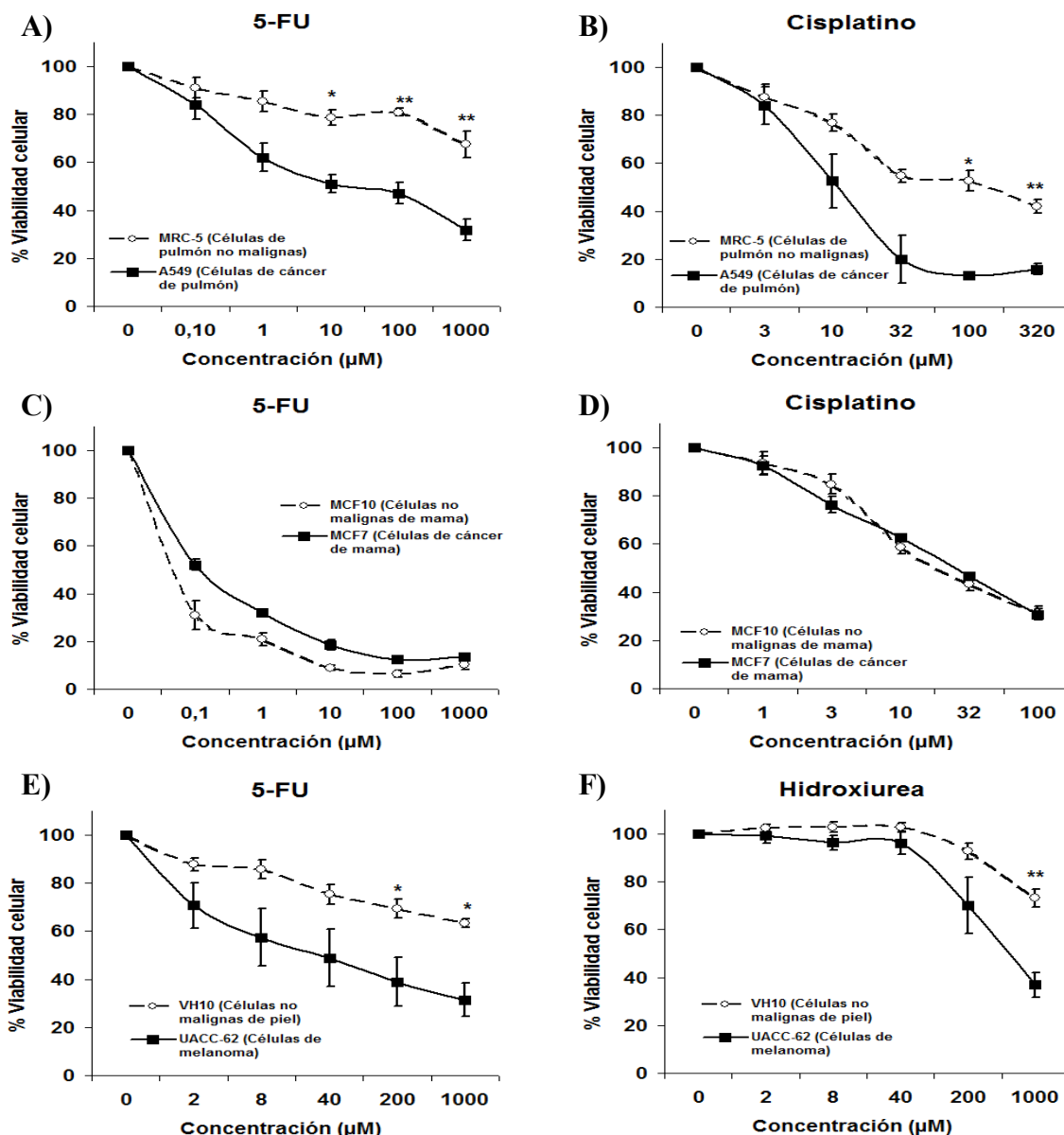


Figura I. Citotoxicidad de fármacos anticancerosos sobre varias líneas celulares cancerosas y no cancerosas. Células cancerosas (A549, MCF7 y UACC-62) y células no malignas (MRC-5, MCF10 y UACC-62) fueron tratadas durante 48 horas con diferentes fármacos anticancerosos utilizados en clínica como controles para la comparación con la citotoxicidad de los compuestos evaluados en esta tesis. Las gráficas A-F) recogen la viabilidad celular tras el tratamiento con los fármacos anticancerosos control, la cual fue medida mediante ensayo MTT. Estos controles fueron utilizados durante todos los ensayos realizados, aquí se recogen solamente los datos obtenidos de tres experimentos independientes que fueron representativos.

## 11. ANEXOS

Una de las estrategias seguidas para la búsqueda de fármacos anticancerosos más selectivos fue la utilización de agentes prooxidantes para elevar los niveles de especies reactivas de oxígeno (EROs) hasta concentraciones tóxicas para células cancerosas sin que se lleguen a afectar células normales. El peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) fue utilizado como control de la mayor sensibilidad de las células cancerosas a las EROs que las células normales. La Figura II recoge tres experimentos MTT representativos del tratamiento con  $\text{H}_2\text{O}_2$  durante 48 horas.

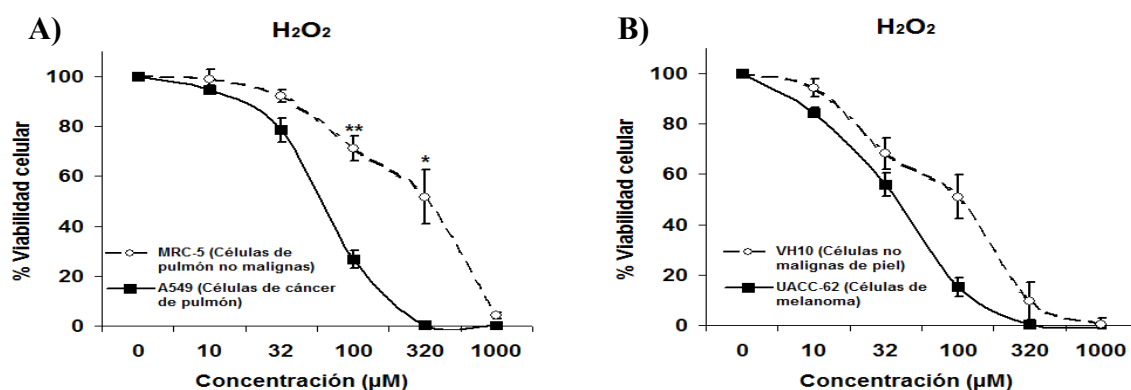


Figura II. Citotoxicidad de peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) sobre varias líneas celulares cancerosas y no cancerosas. Células cancerosas A549 y UACC-62 y células no malignas MRC-5 y VH10 fueron tratadas con  $\text{H}_2\text{O}_2$  durante 48 horas. Transcurrido ese tiempo, la viabilidad celular fue obtenida realizando el ensayo MTT.

El  $\text{H}_2\text{O}_2$  fue también utilizado como control en el estudio de la posible implicación de la generación de EROs en el efecto citotóxico de los compuestos estudiados durante esta tesis. En estos ensayos fue estudiado los cambios en el efecto citotóxico de los compuestos evaluados en presencia y ausencia de antioxidantes. El  $\text{H}_2\text{O}_2$  fue utilizado como control de la actividad de los antioxidantes, ya que estos antioxidantes son capaces de eliminar totalmente el efecto citotóxico de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . En la Figura III son representados los resultados obtenidos de tres experimentos independientes representativos del resto de ensayos en los que se utilizó el  $\text{H}_2\text{O}_2$  como control.

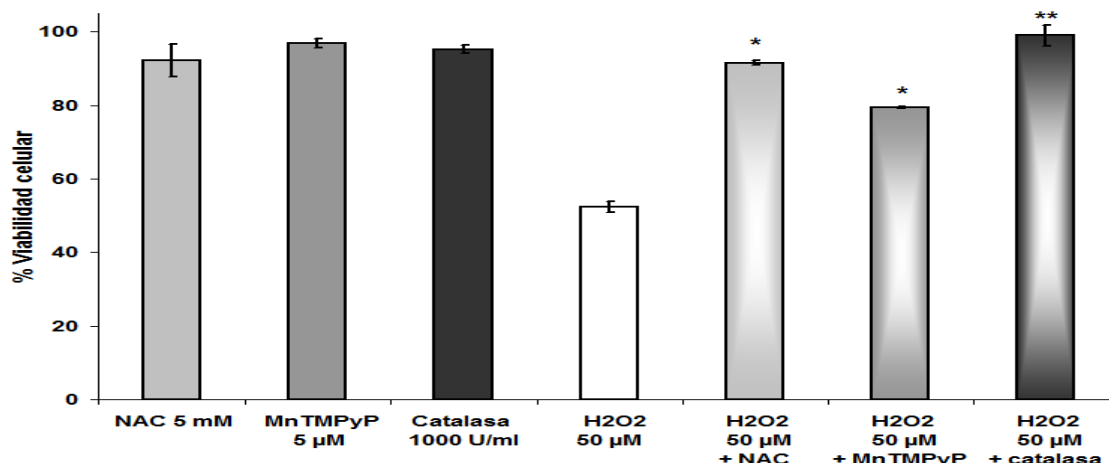


Figura III. Eliminación del efecto citotóxico del control positivo  $H_2O_2$  por antioxidantes. Esta figura representa la viabilidad de células A549 tras el tratamiento con  $H_2O_2$  en presencia o ausencia de antioxidantes (catalasa, NAC y MnTMPyP) durante 48 h. Aquí son representados los datos obtenidos de tres experimentos representativos en los que se utilizó  $H_2O_2$  como control.

### I.II. CONTROLES DE LAS LÍNEAS DECICIENTES EN LA REPARACIÓN DEL DAÑO EN EL ADN.

La evaluación de la interferencia de los mecanismos de reparación del daño en el ADN en la actividad citotóxica de los compuestos estudiados en esta tesis fue realizada con ensayo MTT o ensayo clonogénico. En estos ensayos siempre hubo presente un control positivo hacia las líneas deficientes, es decir, un compuesto que se sabe que presenta mayor actividad citotóxica sobre células deficientes en una vía de reparación del daño en el ADN que sobre células no deficientes. La Tabla II recoge los valores obtenidos de  $IC_{50}$  de los controles utilizados. Estos valores fueron obtenidos de tres experimentos representativos de todos los ensayos realizados. Los controles positivos escogidos fueron etopósido para las vías HR, NHEJ y FA, luz ultravioleta para el estudio de NER y peróxido de hidrógeno para la vía BER (ver la revisión *Effect of DNA repair deficiencies on the cytotoxicity of drugs used in cancer therapy – A review* en el apartado de Antecedentes para mayor explicación).

Células		IC50 (media $\pm$ SEM; $\mu$ M)		
		Etopósido	UV (J/m <sup>2</sup> )	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
No deficientes	BER	-	-	127,5 $\pm$ 2,1
	NER	-	20	-
	HR	0,8 $\pm$ 0,1	-	-
	NHEJ	7,0 $\pm$ 1,8	-	-
	FA	15,0 $\pm$ 1,4	-	-
Deficientes	BER	-	-	80,4 $\pm$ 1,7
	NER	-	5	-
	HR	0,1 $\pm$ 0,0	-	-
	NHEJ	3,2 $\pm$ 1,3	-	-
	FA	4,1 $\pm$ 0,7	-	-

Tabla II. Ejemplos representativos de los valores de IC50 mostrados por los compuestos controles utilizados durante el estudio del papel de los mecanismos de reparación del daño en el ADN en el efecto citotóxico de los compuestos testados en esta tesis. Estos datos fueron calculados a partir de los datos obtenidos de la viabilidad celular tras la exposición de 2 ó 48 h, en los casos de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y etóposido respectivamente, o tras la exposición a luz ultravioleta (UV) y 24 horas de recuperación de la irradiación (MTT).

### I.III. CURCUMINA COMO CONTROL POSITIVO DE INDUCCIÓN DE APOPTOSIS.

Curcumina fue utilizada en cada ensayo de evaluación del tipo de muerte celular como control positivo, debido a que curcumina es un claro inductor de apoptosis. La Figura IV muestra un ejemplo elaborado con los datos obtenidos de 3 experimentos representativos de todos los experimentos realizados.

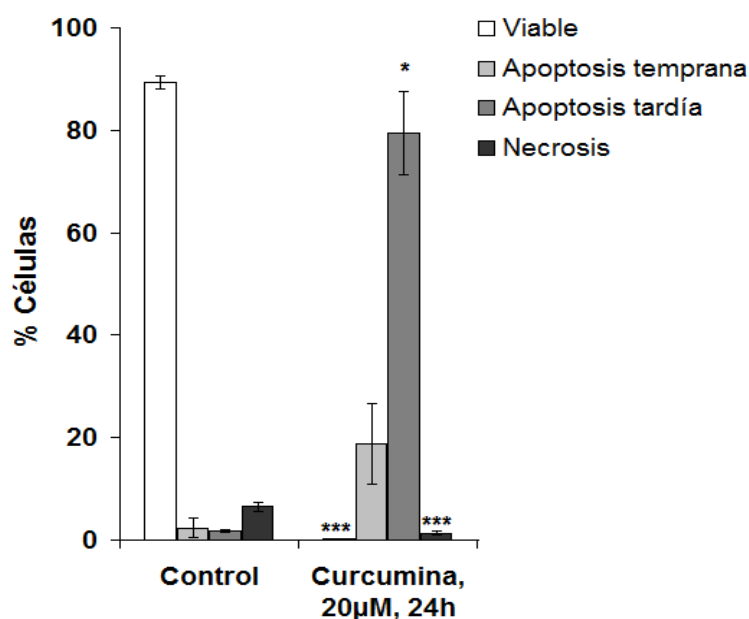


Figura IV. Curcumina como control positivo de apoptosis. En los experimentos de detección del tipo de muerte celular, curcumina fue utilizada como control positivo de apoptosis. Las células fueron tratadas con 20  $\mu$ M de curcumina durante 24 h. La gráfica muestra los resultados obtenidos del uso de curcumina como control en tres experimentos representativos.

#### I.IV. CONTROLES UTILIZADOS EN LA EVALUACIÓN DEL DAÑO EN EL ADN.

En los ensayos de evaluación del daño en el ADN fueron utilizados como controles positivos:

- \* En el ensayo cometa: camptotecina y  $H_2O_2$  por su capacidad de generar daño en el ADN (Figura V).

- \* En el ensayo de inmunofluorescencia de focos de  $\gamma$ H2AX: irradiación con rayos X, que generan daño en el ADN por roturas de doble cadena (Figura VI).

- \* En la técnica TARDIS: camptotecina y etopósido, dos inhibidores de topoisomerasas (Figura VII).

En los tres ensayos estos controles estuvieron siempre en la realización de los experimentos. En las Figuras V-VII son recogidos los resultados de estos controles en 3 experimentos representativos del resto.

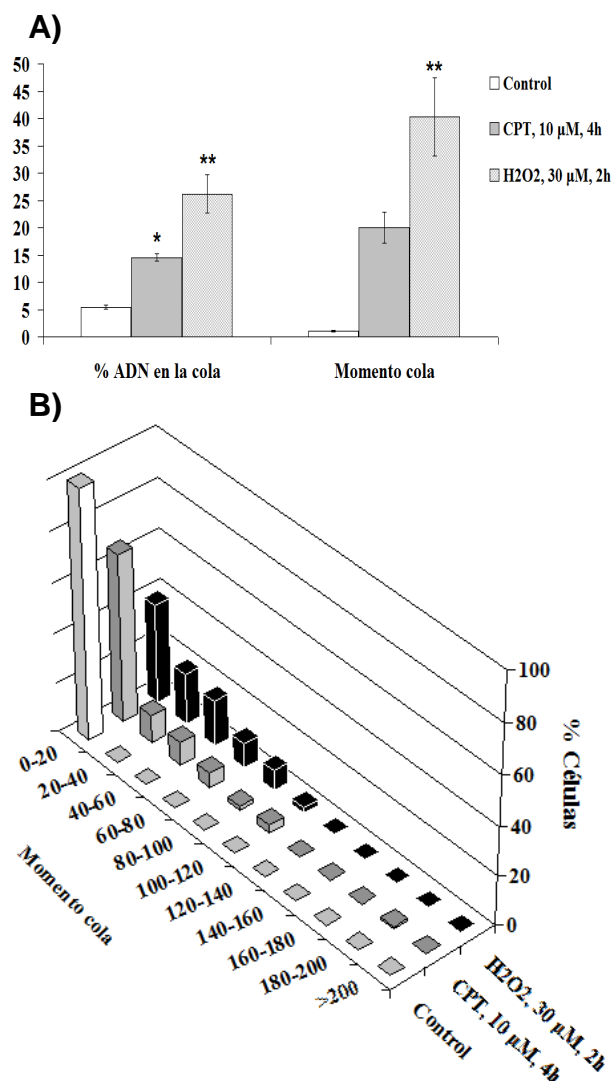


Figura V. Daño en el ADN mostrado por los controles positivos camptotecina y peróxido de hidrógeno. Camptotecina (CPT) y peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) fueron utilizados como controles positivos de daño en el ADN en los ensayos del cometa realizados en esta tesis. Los datos recogidos en estas gráficas son el resultado de la media de 3 experimentos representativos.



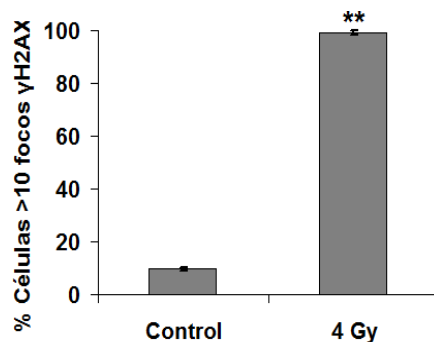


Figura VI. Inducción de focos de  $\gamma$ H2AX por rayos-X. Irradiación con 4 Gy de rayos X fue utilizada como control positivo en la detección de daño en el ADN por roturas de doble cadena mediante el ensayo inmunocitoquímico de focos de  $\gamma$ H2AX.

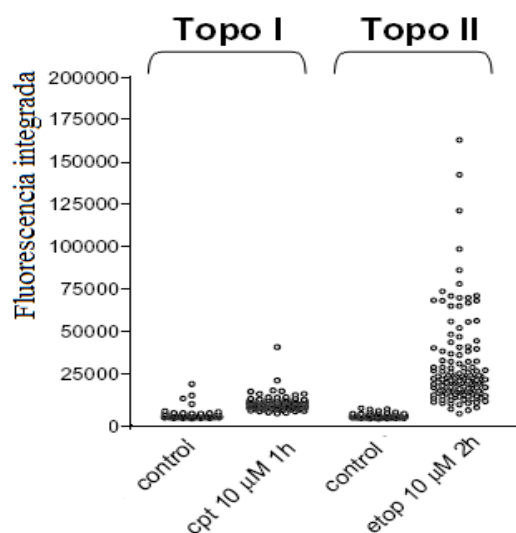


Figura VII. Formación de complejos ADN-topoisomerasas por los venenos de topoisomerasa camptotecina y etopósido. Esta figura representa un ejemplo de los resultados obtenidos con los venenos de topoisomerasa camptotecina (cpt) y etopósido (etop) de un ensayo TARDIS representativo.

#### I.V. CONTROLES UTILIZADOS EN LA EVALUACIÓN DE LA ALTERACIÓN DE LA GLICÓLISIS.

Durante la evaluación de la capacidad de inhibir la glicólisis por alguno de los compuestos estudiados en esta tesis, fueron utilizados como controles negativos el cisplatino y el 5-fluorouracilo (5-FU), fármacos anticancerosos cuyo mecanismo de acción es la generación de daño en el ADN, mientras que como control positivo se utilizó el inhibidor de glicólisis dicloroacetato. La Figura VIII muestra los porcentajes de producción de lactato (producto final de la glicólisis) y de consumo de glucosa (producto inicial de la glicólisis) por los controles utilizados. Estos datos pertenecen a las medias de tres experimentos representativos.

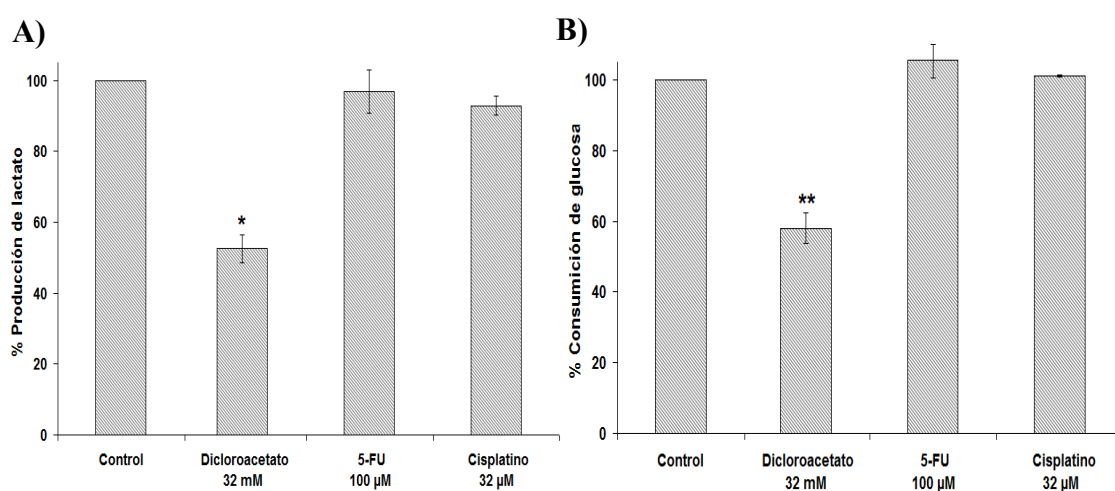


Figura VIII. Influencia en la glicólisis de dicloroacetato, cisplatino y 5-fluorouracilo. En los experimentos de estudio de la inhibición de la glicólisis, fueron utilizados como controles negativos 5-fluorouracilo (5-FU) y cisplatino, en cuyo mecanismo de acción no está involucrada la glicólisis, mientras que como control positivo se utilizó el dicloroacetato, un aceptado inhibidor de la glicólisis.